

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
FAKULTA TEXTILNÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

LIBEREC 2013

Bc. MARIE PEŠKOVÁ

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

FAKULTA TEXTILNÍ



Studijní program: N3108 Průmyslový management

Studijní obor: 3106T014 Produktový management

Elektrostatické zvlákňování směsi polykaprolaktonu a chitosanu a jeho biologické testování

Electrospinning of blend of polycaprolactone and chi- tosan and its cell investigation

Bc. Marie Pešková

KHT- 197

Vedoucí diplomové práce: Ing. Petr Mikeš, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Jana Horáková

Rozsah práce:

Počet stran textu ... 55

Počet obrázků 28

Počet tabulek 12

Počet grafů..... 8

Počet stran příloh.. 32

Zadání

P r o h l á š e n í

Byl(a) jsem seznámen(a) s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracoval(a) samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce a konzultantem.

Datum

Podpis

Poděkování:

Děkuji Ing. Petru Mikešovi, Ph.D., Mgr. Janě Horákové a Ing. Janě Müllerové, Ph.D. za vstřícnost, cenné připomínky, odborné rady a za čas věnovaný konzultacím. Poděkování patří také Centralizovanému rozvojovému projektu č. 12091 s názvem *Integrovaný systém vzdělávání v tkáňovém inženýrství, regenerativní medicíně a nanobiotechnologiích na UK, ČVUT a TUL*.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá elektrostatickým zvlákňováním směsi polykaprolaktonu a chitosanu a jeho biologickým testováním. Práce obsahuje dvě hlavní části – část teoretickou a část experimentální. V teoretické části práce jsou popsány základní principy tkáňového inženýrství, tkáňový nosič a jeho způsoby výroby a využití biodegradabilních polymerů v tkáňovém inženýrství. Všechny části jsou zaměřeny na použití polymerů pro biologické testování – polykaprolaktonu a chitosanu. Oba polymery byly rozpuštěny ve směsi kyseliny octové a kyseliny mravenčí, a úspěšně zvlákňeny. Vzhledem k přítomnosti zbytkových kyselin v nanovlákněných vrstvách, bylo zkoumáno jejich vymytí. Pro ověření přítomnosti obou polymerů po vymytí byla použita ART – FTIR spektroskopie. Buněčná proliferace byla vyhodnocena testem MTT, fluorescenční mikroskopií a rastrovací elektronovou mikroskopií. Výsledky ukazují, že tyto materiály se zdají být biokompatibilní s 3T3 myšími fibroblasty.

KLÍČOVÁ SLOVA:

elektrostatické zvlákňování

biodegradabilní polymery

polykaprolakton

chitosan

tkáňové inženýrství

tkáňový nosič

ANOTATION

The diploma thesis deals with electrospinning of polycaprolactone and chitosan blend and its *in vitro* testing. The thesis is composed from 2 main parts: theoretical and experimental one. Tissue engineering approaches, biodegradable scaffold production and application are described in the theoretical part of the work. All the parts are focused on polymers used for cell investigation – polycaprolactone and chitosan. Both polymers were dissolved in mixture of acetic and formic acid and successfully electrospun. Due to the possibility of residual acids in the nanofibrous layers, washing out of the material has to be investigated. To verify the presence of both polymers after washing procedure, ART –FTIR spectroscopy was used. Cell proliferation was assessed by MTT assay, fluorescence microscopy and scanning electron microscopy. The results show that these materials seem to be biocompatible with 3T3 mouse fibroblasts.

KEY WORDS:

electrospinning

biodegradable polymers

polycaprolactone

chitosan

tissue engineering

scaffold

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| POUŽITÉ ZKRATKY | 10 |
| ÚVOD | 11 |
| 1 ZÁKLADNÍ PRINCIPY TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ | 13 |
| 1.1 Proces tkáňového inženýrství..... | 14 |
| 1.2 Rozdělení buněčných kultur a jejich kultivace | 15 |
| 1.2.1 Kultivace buněk | 16 |
| 1.2.1.1 Médium pro kultivované buňky | 16 |
| 1.3 Extracelulární matrix..... | 17 |
| 2 TKÁŇOVÝ NOSIČ | 20 |
| 2.1 Výroba tkáňového nosiče | 21 |
| 2.1.1 Textilní způsob výroby | 21 |
| 2.1.2 Netextilní způsob výroby..... | 21 |
| 2.2 Elektrostatické zvlákňování | 22 |
| 3 BIOLOGICKY ROZLOŽITELNÉ POLYMERY POUŽÍVANÉ PRO VÝROBU TKÁŇOVÉHO NOSIČE | 25 |
| 3.1 Vybrané biologicky rozložitelné přírodní polymery..... | 25 |
| 3.1.1 Chitosan | 26 |
| 3.2 Vybrané biologicky rozložitelné syntetické polymery | 27 |
| 3.1.2 Polykaprolakton | 28 |
| 4 VÝROBA TKÁŇOVÉHO NOSIČE SMĚSI PCL/CS ELEKTROSTATICKÝM ZVLÁKŇOVÁNÍM | 31 |
| 4.1 Použité chemikálie | 31 |
| 4.2 Použitá zařízení | 31 |
| 4.3 Použité metody pro zhodnocení nanovláknenné vrstvy..... | 32 |
| 4.3.1 Měření průměrů vláken - Program NIS Elements AR..... | 32 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.3.2 | Měření kontaktního úhlu..... | 32 |
| 4.3.3 | FTIR spektroskopie a mikroskopie..... | 32 |
| 4.4 | Výroba nanovlákněné vrstvy ze směsi polykaprolaktonu s chitosanem..... | 33 |
| 4.4.1 | Příprava roztoků..... | 33 |
| 4.4.2 | Elektrostatické zvlákňování polykaprolaktonu..... | 33 |
| 4.4.3 | Elektrostatické zvlákňování směsi polykaprolaktonu a chitosanu | 36 |
| 5 | ANALÝZA TKÁŇOVÉHO NOSIČE | 38 |
| 5.1 | Použité chemikálie | 38 |
| 5.2 | Použitá zařízení | 38 |
| 5.3 | Ověření přítomnosti chitosanu pomocí ART-FTIR spektrometrie | 38 |
| 5.3.1 | Vymývání zbytkových kyselin z nanovlákněné vrstvy směsi PCL/CS různými roztoky..... | 41 |
| 5.3.1.1 | Promývání destilovanou vodou | 42 |
| 5.3.1.2 | Promývání 70 % ethanolem..... | 44 |
| 5.3.1.3 | Promývání 96% ethanolem..... | 45 |
| 5.3.1.4 | Promývání 100% ethanolem..... | 47 |
| 5.3.1.5 | Promývání zředěným roztokem amoniaku | 48 |
| 5.4 | Odstranění kyselin z nanovlákněné vrstvy určené pro biologické testování ... | 49 |
| 6 | BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ TKÁŇOVÉHO NOSIČE..... | 52 |
| 6.1 | Použité chemikálie | 52 |
| 6.2 | Buněčný materiál | 52 |
| 6.3 | Použitá zařízení | 52 |
| 6.4 | Použité metody..... | 53 |
| 6.4.1 | MTT test | 53 |
| 6.4.2 | Fluorescenční mikroskopie | 53 |
| 6.4.3 | SEM | 53 |
| 6.5 | In vitro testování | 54 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 6.5.1 | Příprava materiálu pro testování | 54 |
| 6.5.2 | Příprava buněk | 54 |
| 6.5.3 | MTT test tkáňových nosičů | 54 |
| 6.5.4 | SEM tkáňových nosičů s buňkami..... | 55 |
| 6.5.5 | Fluorescence buněk v tkáňovém nosiči | 55 |
| 7 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 57 |
| 7.1 | Průměr vláken | 57 |
| 7.2 | Kontaktní úhel..... | 59 |
| 7.3 | In vitro testy | 61 |
| 7.3.1 | MTT test | 61 |
| 7.3.2 | SEM | 64 |
| 7.3.3 | Fluorescence | 64 |
| | ZÁVĚR | 66 |
| | POUŽITÁ LITERATURA | 67 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ..... | 70 |
| | ZDROJE OBRÁZKŮ | 71 |
| | ZDROJE TABULEK..... | 71 |
| | SEZNAM TABULEK | 72 |
| | SEZNAM GRAFŮ | 72 |
| | SEZNAM PŘÍLOH | 73 |

POUŽITÉ ZKRATKY

| | |
|------------|--|
| PCL | polykaprolakton |
| CS | chitosan |
| SEM | rastrovací elektronový mikroskop |
| ECM | extracelulární matrix |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium – médium pro savčí buňky |
| ECM | extraceluliární matrix |
| PLA | polymléčná |
| PGA | polyglykolová kyselina |
| PLGA | kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové |
| PEG | polyethylenglykol |
| ART – FTIR | Attenuated Total Reflectance - Fourier transform infrared spectroscopy |
| SEM | scanning electron microscope – rastrovací elektronový mikroskop |
| PBS | Phosphate Buffered Saline – stabilizační roztok |
| FBS | Fetal Bovine Sera |
| EDTA | ethylenediaminetetraacetic acid - etylendiamintetraoctová kyselina |
| Ge | germanium |

ÚVOD

V posledních několika letech se polymery staly nedílnou součástí našeho života. S rostoucím vývojem se využití polymerů rozšířilo i do oblasti medicíny. Existují stovky polymerů, ale jen několik jich je použitelných pro medicínské účely, například jako tkáňová náhrada. Hlavní pozornost je dána na materiály, které podléhají degradaci. Výhodou těchto polymerů je, že nevyvolávají chronické reakce na cizí těleso, které při chirurgických zákrocích zůstává v těle, protože jsou postupně vstřebávány. Díky vstřebatelnosti nejsou potřebné další operace pro vyjmutí implantátu. Velké uplatnění nacházejí tyto polymery právě v tkáňovém inženýrství, kde se používají jako nosiče buněk. Buňky tkáňovou náhradu prorůstají a vytváří tak novou tkáň. Vše je regulováno příslušnými normami, které polymerní materiál musí splňovat.

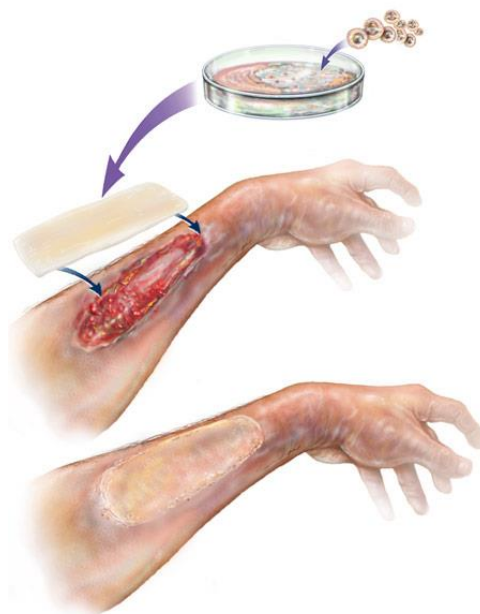
Velký význam pro tkáňové inženýrství má právě chitosan. Tento přírodní polymer je vhodný hlavně z důvodu antibakteriálního účinku. Jeho samotné zvlákňování je obtížné a proto je vhodné ho směšovat s jinými polymery, například s polykaprolaktonem. Směsí polymerů vznikne materiál s novými vlastnostmi - antibakteriálním účinkem, dostatečnou pevností a zkrácenou dobou degradace oproti polykaprolaktonu samotnému.

Cílem této práce bylo vytvořit nanovláknenné vrstvy ze směsi polykaprolaktonu s chitosanem v různých koncentracích s vhodným rozpouštědlovým systémem a jejich biologické testování vitro s 3T3 myšími fibroblasty.

TEORETICKÁ ČÁST

1 ZÁKLADNÍ PRINCIPY TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ

První definici tkáňového inženýrství přinesli Robert Langer a Joseph Vacanti. Tkáňové inženýrství označili jako interdisciplinární obor, který využívá technické a biologické vědní obory k rozvoji biologických náhrad za účelem jejich obnovy, zachování, zlepšení nebo úplné náhrady [1]. Je to obor, ve kterém spolupracují biologové, chemici, fyzici, textilní a strojní inženýři a další vědci. Tkáňové inženýrství se dá definovat ale i jinak. Jedná se o remodelaci a regeneraci tkáně *in - vivo*¹ a kultivaci funkčních tkání *in - vitro*² pro implantaci do organismu jako biologická náhražka poškozených nebo nefunkčních tkání a orgánů [2]. Tkáňové inženýrství se zabývá biologickými náhradami, jejich vývojem a využitím buněk a molekul k vytvoření nové vhodné tkáně. Je možné vytvořit náhradu kosti, chrupavky, krevní cévy, močového měchýře, srdeční chlopně, kůže a také svalů [3]. Tkáňová náhrada se skládá z nosiče buněk a z buněk na něm uchycených. Nosičem buněk mohou být biologické molekuly (proteiny ECM, kolagen, elastin, kyselina hyaluronová) nebo umělý materiál (syntetické polymery, keramika, kovy a jejich slitiny). Scaffold³ dává buňkám prostor pro růst a množení, nahrazuje ECM, které bylo zničeno nemocí, zraněním nebo vrozenou vadou. Na obrázku 1 je zjednodušeně ukázáno použití tkáňové náhrady (dále scaffoldu).



Obrázek 1 Použití tkáňové náhrady [1]

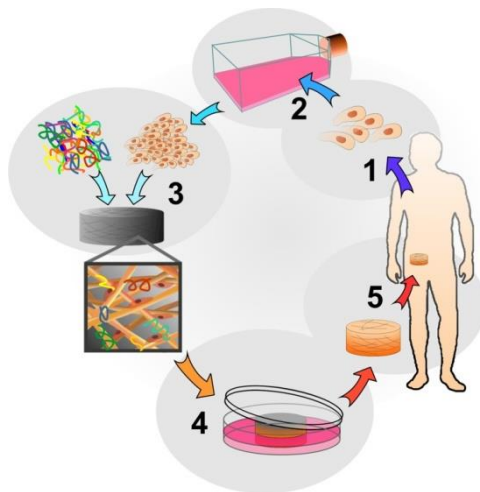
¹ *in - vivo* – z latiny v životě, v živém organismu

² *in - vitro* – z latiny ve skle, mimo tělo ve zkumavce

³ scaffold – tkáňový nosič, podpůrná konstrukce pro růst buněk a celých tkání

1.1 Proces tkáňového inženýrství

Celý proces tkáňového inženýrství se skládá z několika částí. Musí se ujít dlouhá cesta od získání buněk přes jejich namnožení, prorůstání scaffoldem až k vytvoření nové funkční tkáně (viz obr. 2).



Obrázek 2 Proces tkáňového inženýrství [2]

Pro proces tkáňového inženýrství jsou buňky velice důležité. Získávají se od jedince, kterému bude následně tkáň implantována nebo od jedince téhož druhu. Postup je následující – provede se biopsie⁴ tkáně, buňky se namnoží a kultivují se v umělém kultivačním médiu. Souběžně se vytvoří scaffold, který bude schopný být pro namnožené buňky vhodným nosičem. Scaffold je prostředím pro jejich migraci, množení a umožní jim přísun živin, které jsou potřebné pro jejich správné fungování. Tkáňový nosič musí mít odpovídající mechanické vlastnosti za účelem použití implantátu.

Vytvořený scaffold se ponoří do roztoku s buňkami a nechá se jimi prorůst. V určité fázi tohoto procesu je možno tento biologický tkáňový nosič použít a implantovat do těla. Mezi základní požadavky vhodného scaffoldu patří kromě biokompatibility také biodegradabilita. Nosič pro buňky by se měl postupně v těle rozložit za účelem vzniku nové tkáně podporované buňkami. Doba rozkladu je závislá na použitém materiálu.

Proces tkáňového inženýrství v bodech:

- odběr buněk

⁴ biopsie - odběr tkáně ze živého organismu

- izolace a kultivace buněk
- vytvoření scaffoldu, osázení buňkami a následné vytvoření trojrozměrné matrice
- implantace
- detekce – analýza vlastností

1.2 Rozdělení buněčných kultur a jejich kultivace

Tkáňové inženýrství využívá buňky jako konstrukční biomateriál. Volba buněk vhodných pro konkrétní aplikaci je klíčovou podmínkou pro úspěšnou léčbu.

Hlavní rozdělení buněk:

- Autologní – zdrojem je pacientova zdravá tkáň, shodný je dárce i příjemce, nehrozí odmítnutí imunitního systému
- Alogenní – buňky pocházejí z různých jedinců stejného druhu
- Heterogenní – dárce buněk je jiný než příjemce, například člověk – prase, nebezpečí odmítnutí imunitního systému
- Diferencované – tkáňově specifické, zdrojem je primární tkáň
- Kmenové – nespecifické buňky, mají schopnost proliferovat a diferencovat se do různých tkání

Pro přípravu tkáně se používají jak kmenové, tak i diferencované buňky. Zdrojem pro kůži jsou například epitelální buňky. Tyto buňky na sebe těsně naléhají a obsahují velmi malé množství ECM. Epitelová tkáň kryje vnější nebo vnitřní povrchy organismu [4]. Dále endotelové buňky se používají pro obnovu cév, chondrocyty⁵ pro chrupavku a osteoblasty⁶ pro kost. Pro regeneraci svalové tkáně se používají svalové buňky [5]. Fibroblasty jsou zdrojem pro vazivové tkáně. Tyto buňky jsou už naprogramovány pro tvorbu specifických specializovaných buněk a tkání [6]. Použití buněk je možné ovlivnit dediferenciací, rediferenciací a transdiferenciací.

- Dediferenciace – ztráta vlastností specializované buňky
- Rediferenciace – umožňuje buňce návrat jejich vlastností

⁵ chondrocyt je hlavní buňka vyskytující se v chrupavce

⁶ osteoblast je kostní buňka

- Transdiferenciace – přeměňuje diferenciovanou buňku v jinou, do buňky typickou pro jiné orgány a tkáně.

1.2.1 Kultivace buněk

Zdrojem buněk pro založení buněčné kultury musí být laboratorní zvíře nebo člověk. Buňky se izolují, čistí, ředí a následně přesouvají do kultivačních nádob. Pěstují se tak dlouho, dokud nezískáme dostatečné množství materiálu pro pokus. Kultivované buňky rostou a množí se za nefyziologických podmínek, tedy v umělém kultivačním médiu. Zralost buněk získaných pro buněčnou kulturu dokáže ovlivnit průběh a výsledky pokusu v porovnání buněk od dospělého jedince a buněk z embrya. Embryonální buňky se snáze kultivují a vzniklé kultury z nich mají delší životnost. Nevýhodou je, že jsou náchylné ke změnám fenotypu⁷ [7]. Práce s těmito kulturami vyžaduje zvláštní vybavení laboratoře. Základními pomůckami pro kultivaci buněk jsou laminární box pro práci s buňkami a inkubátor s potřebnou atmosférou pro jejich pěstování. Jedním z hlavních požadavků laboratoře je udržení sterility a zabránění kontaminací.

Pro proliferaci pěstovaných buněk *in – vitro* je potřeba zajistit vhodné podmínky. Pro jejich množení je důležitý povrch kultivační nádoby, složení kultivačního media, teplota a složení atmosféry. Buňky se pěstují ve speciálních inkubátorech s CO₂ (5%) a s vlhkostí 90% při tělesné teplotě 37°C. Zvýšená koncentrace CO₂ se podílí na udržení pH média. Tyto inkubátory dokážou poskytnout potřebné podmínky pro kultivaci. K pěstování buněk se používají polystyrénové kultivační nádoby, jejichž povrch je upravený plasmou tak, aby byl hydrofilní. Kultivace buněk probíhá v médiu obsahujícím potřebné živiny. Většinu buněk nelze kultivovat do nekonečna. Kultivované buňky mají omezenou životnost, po několika pasážích stárnou a jejich další dělení se postupně zastaví. Někdy ke stárnutí nedojde a buňky se dělí neomezeně, tuto vlastnost mají obvykle kultury tvořené nádorovými buňkami [7].

1.2.1.1 Médium pro kultivované buňky

Médium, ve kterém se buňky kultivují, nahrazuje do určité míry extracelulární tekutinu. Kompletní médium se skládá ze séra, antibiotik a DMEM (druh kultivačního média pro savčí buňky). Kultivační medium obsahuje látky jako jsou: voda, jednoduché cukry – glukóza nebo fruktóza pro zdroj energie, vitaminy, anorganické soli, pufrý, bílkoviny, mastné kyseliny, sérum (skládá se z růstových faktorů, proteinů a hormonů),

⁷ fenotyp – jedná se o soubor všech pozorovatelných vlastností a znaků živého organismu

lipidy, stopové prvky a některé peptidy. Z antibiotik se nejčastěji používá penicilin. Je vhodný hlavně z důvodu, že je netoxický a rychle se v mediu rozpadá. Účel použití antibiotik je, aby zabránili kontaminaci kultury bakteriemi.

Součástí média je také acidobazický indikátor pH. Slouží k identifikaci pH média. Pro tento účel se používá fenolová červen. Jasně červená barva je při pH 7,4, je-li roztok kyselý - barva je se blíží ke žluté, je-li prostředí alkalické - barva je směrem k fialové. Přídavek toho indikátoru do média ulehčuje práci s buněčnými kulturami. Díky němu se dá rozpoznat kyselost prostředí. Rostoucí buňky vylučují do média kyselé katabolity⁸ a ty způsobí, že médium zežloutne. Změna barvy do žluta dává signál pro výměnu média [7].

1.3 Extracelulární matrix

ECM nebo-li mezibuněčná hmota vytváří oporu pro buňky. Živočichové musí být tvořeny z takových tkání, které jsou schopny rychlého pohybu. Buňky, z nichž jsou tyto tkáně tvořeny, musí být schopné vytvářet a přetvářet síly a velmi rychle měnit tvar. Extracelulární matrix představuje podpurnou síťovinu mezibuněčné hmoty, umožňuje uchycení buněk a pružnost tkáně. Má velice významnou roli v buněčné diferenciaci a je nezbytná pro buněčnou komunikaci. Bez ECM by molekuly buňky stěží držely pospolu [8].

Hlavní úkoly ECM:

- propojit různé tkáně těla dohromady
- schopnost přenášet pohyb
- udržovat tvar tkání – fyzická podpora buněk tkání
- umožnit přísun živin a vody
- umožnit odsun produktů metabolismu do nitra a ven z buněk
- umožňuje komunikaci mezi buňkami – funguje jako informační systém

Buňky mají schopnost udržovat mezi sebou těsný kontakt a komunikovat mezi sebou. Na svém povrchu mají specifické proteiny, které umožňují jejich shlukování do specifických tkání. Vše je možné díky specifickým spojení, která podporují tuto komunikaci (viz tabulka 1). ECM je buňkami sice produkována, ale není v nich umístěna.

⁸kyselé katabolity – odpadové produkty buněk okyselující prostředí média

Liší se svými fyzikálními vlastnostmi, podle vlastností a funkce příslušné tkáně. Kostí a zuby mají ECM velmi tvrdou. V chrupavce a v pojivové tkáni kůže je ECM pórovitá a ve šlachách je velmi pružná. ECM se může vyskytovat také v tekuté formě – plasma představuje ECM krve [5].

Tabulka 1 Typy spojů a funkce spojení mezi buňkami

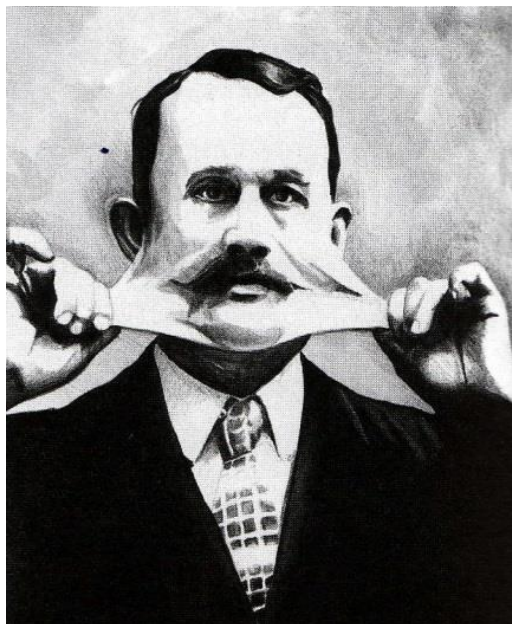
| Typy spojů | Funkce spojů |
|---------------------------|----------------------------|
| komunikační buněčné spoje | komunikace mezi buňkami |
| přichytné buněčné spoje | uchycení buněk k ECM |
| izolační buněčné spoje | mechanické propojení buněk |

U některých tkání – kostí nebo u šlach převažuje ECM, která je z mechanického hlediska nejdůležitější. U jiných jako u svalů nebo pokožky je minimum ECM a mechanickou zátěž nese cytoskelet⁹ buněk. Znamená to tedy, že jsou buňky propojeny jedna k druhé, aby mohly být oporou pro zátěž [8].

ECM se skládá ze třech hlavních typů makromolekul: glykosaminoglykanů a proteoglykanů (poskytují tkáním gelovitou strukturu), fibrózních proteinů (paří sem kolagen, který poskytuje pevnost a elastin, který zajišťuje pružnost) a jako třetí typ představují multiadhezní molekuly (umožňují přímé spojení s ECM). Základní roli v ECM hrají proteiny, které se vážou na adhezní receptory – integriny, ty zprostředkovávají adhezi buněk k ECM. Proteiny ECM jsou schopné vázat růstové faktory, jako jsou například hormony a regulovat jejich distribuci [5].

Kolagen, jeden z velmi důležitých fibrózních proteinů ECM, je zastoupen hlavně v pokožce, šlachách, kostech, rohovce, ve stěnách cév, chrupavce anebo také v placentě [9]. Kolagen zajišťuje pevnost tkání díky své molekule, která je dlouhá. Jednotlivé fibrily vláken se skládají v mnohem silnější kolagenová vlákna nebo jsou připojeny složkami ECM. Nejsou-li kolagenové fibrily správně uspořádány, má to za následek genetický defekt kolagenázy. Výsledkem toho to defektu je snížená pevnost v tahu a kůže s pojivovou tkání se stanou mimořádně elastickými (viz obrázek 3) [8].

⁹ Cytoskelet – opora buňky, “kostra buňky“

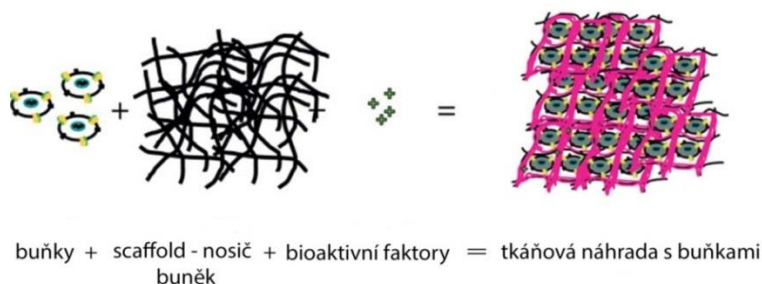


Obrázek 3 Extrémně elastická kůže, následek špatného uspořádání fibril kolagenu [3]

Dalším důležitým představitelem skupiny fibrózních proteinů ECM je elastin. Jeho přítomnost je hlavně tam, kde je potřeba elasticita – arterie, plíce, tepny, kůže a chrupavka. Kolagen a elastin jsou představitelé stavebních proteinů. Zastoupení těchto makromolekul určuje fyzikální vlastnosti tkání danou pevností a pružností [8].

2 TKÁŇOVÝ NOSIČ

Tkáňový nosič zajišťuje buňkám dočasnou nebo trvalou podporu pro migraci, růst a podněty pro následné buněčné pochody [10]. Jedná se o trojrozměrnou tkáňovou matici (viz obrázek 4), která sama nebo v kombinaci s živými buňkami zajistí v místě poškození regeneraci či novou funkční tkáň. Poskytuje dočasnou podporu a usnadňuje její regeneraci. Od začátku až do fáze degradace by si měl scaffold udržet svůj tvar [11]. Nosiče mohou být vlákenné, pěnové, ve formě hydrogelu nebo kapsle. Scaffoldy by měly být reprodukovatelně zpracovatelné do požadovaných struktur a tvarů, měly by být schopné si udržet tvar i po implantaci. Důležitá je podpora materiálu pro růst buněk, spolupráce s transplantovanými buňkami a možnost zachovat si svoji funkci [12]. V tabulce 2 jsou sepsány funkce a vlastnosti scaffoldu vhodného pro použití *in-vivo*.



Obrázek 4 Struktura podpůrné konstrukce [4]

| FUNKCE | VLASTNOST |
|---|---|
| Bez zánětlivé reakce | Biokompatibilní, netoxický, nekarcinogenní |
| Rovnoměrná hustota naočkovaných buněk | Vysoká pórovitost a propojení mezi póry |
| Vhodný povrch pro adhezi a rozptřeni buněk | Optimální vlastnosti použitého polymeru |
| Podporovat rozmnožování a pohyb buněk | Optimální velikost umožňuje buňkám pohyb a komunikaci |
| Biologická vstřebatelnost scaffoldu | Rychlost degradace – rychlost formace nové tkáně |
| Zachování tvaru <i>in vivo</i> s dostatečnou mechanickou pevností | Podobné mechanické vlastnosti jako rozvíjející tkáň |

Tabulka 2 Funkce a vlastnosti scaffoldu [1]

Elektrostatické zvlákňování směsi polykaprolaktonu a chitosanu a jeho biologické testování

K degradaci scaffoldu dojde po určité době po implantaci. Rychlost rozložení je závislá na složení polymeru, podmínkách výroby scaffoldu, okolním prostředí a velikosti pórů (velikost pórů je dána účelem použití). Osázený nosič buňkami se kultivuje v bioreaktoru, který slouží pro podporu vzniku nové tkáně za umělých podmínek [13].

2.1 Výroba tkáňového nosiče

Scaffoldy se vyrábějí z tkaných, pletených a netkaných materiálů. Způsoby výroby se dělí na textilní a netextilní. Netextilní způsob výroby představuje různé technologie, kterými je možné vytvořit vhodný pórovitý povrch. Důležité je pro oba způsoby výroby, aby si scaffold zachoval svoji funkci a měl vyhovující vlastnosti.

2.1.1 Textilní způsob výroby

Jedná se o tkaniny, pleteniny a netkané textilie. U tkanin a pletenin je problém příliš velkých vláken, buňky se nedokáží pořádně zachytit. Dalším problémem je čistota a nemožnost vyřiznutí tvaru u pletenin – materiál se párá.

- **tkaniny** – jejich použití pro scaffoldy není tak časté, využívají se hlavně trojrozměrné tkaniny – víceosnovní tkani
- **pleteniny** – zátažné pleteniny jsou roztažné, poddajné, prodyšné a stlačitelné. Osnovní pleteniny mají nízkou roztažnost. Jak u tkanin, tak i u pletenin je možné pomocí vazby měnit porozitu.
- **netkané textilie** – nevznikají z přízí, mají možnost různé orientace vláken. Výhodou netkaných textilií je levná výroba a vytvoření vhodné velikosti pórů pro buňky. Nejvhodnější způsob výroby scaffoldů pro biomedicínské aplikace je elektrostatické zvlákňování. Tato technologie umožňuje vytváření dutých vláken a vlákna s léčivem. Problémem u této technologie jsou malé póry.

2.1.2 Netextilní způsob výroby

Netextilní způsob výroby scaffoldu představují metody založené na nesmísitelnosti prvků vymytí částic nebo odpaření rozpouštědla. Mezi netextilní způsoby patří solvent casting, salt leaching (vymývání částic), rapid prototyping, zpěňování plynem a freeze drying (lyofilizace)

- **solvent casting** – metoda je založena na odpařování rozpouštědla z roztoku. Buď se položí forma do rozpouštědla, nebo se rozpouštědlo dá do formy a za určitý čas

se rozpouštědlo odpaří. Odpařením rozpouštědla se vytvoří póry. Nevýhodou této metody je, že se používají vysoce toxická rozpouštědla, která mohou denaturovat proteiny.

- **salt leaching** (vymývání částic) – póry jsou tvarovány na základě částic - porogenu (může to být sůl, vosk, cukr). Vhodný polymer se rozpustí v rozpouštědle, porogen je umístěn do formy a následně zalit roztokem polymeru. Po odpaření rozpouštědla vznikne tuhý materiál s částicemi porogenu. Pro finální získání požadovaného materiálu musí dojít k vymytí částic. Dle porogenu se řídí velikost částic, mohou být nepravidelné, kulaté nebo mít vlákněný charakter [13].

- **rapid prototyping** – model scaffoldu je navržen počítačem, je k tomu využita 3D tiskárna. Místo ingoustu je použit polymerní roztok nebo tavenina dobrá pro tvarově komplikované objekty. Tuto metodu je možné kombinovat s metodou vymývání částic.

- **zpěňování plynem** – polymery jsou plastifikovány pomocí vysokého tlaku okolního plynu. Viskozita polymeru klesá, když plyn proniká dovnitř a rozpouští se v polymeru – porogenem se stává plyn. Tuto metodu je též možné kombinovat s metodou vymývání částic [13].

- **sušení za mrazu** (= lyofilizace = freeze-drying) tato metoda je založena na nemišitelnosti dvou rozpouštědel, polymer je smíchán s rozpouštědlem a pak se do roztoku vmíchá nerozpouštědlo.

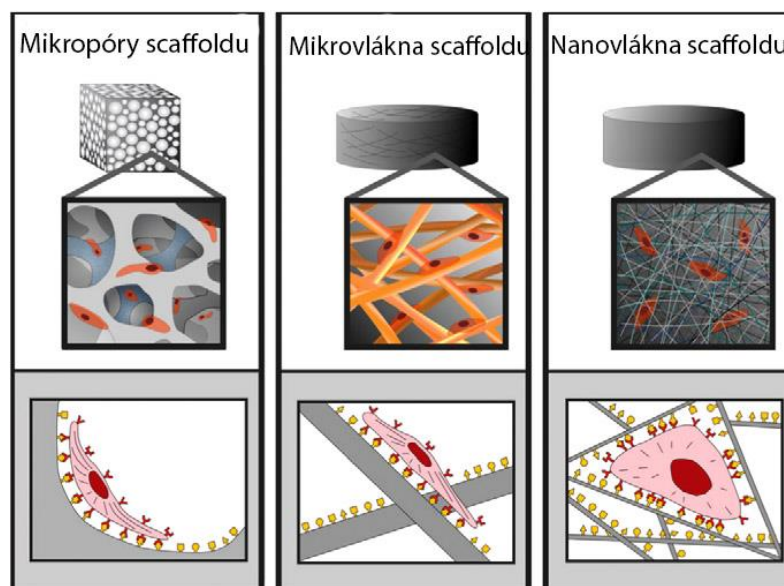
2.2 Elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování (electrospinning) je jedním z častých způsobů výroby tkáňových nosičů. Tato metoda umožňuje výrobu netkaných textilií s vlákny o průměru několika stovek nanometrů. Výsledné materiály vykazují velmi dobré mechanické vlastnosti a stávají se tak atraktivními pro řadu technologií (ochranné materiály, filtrační membrány, elektrické a optické aplikace, nanovlákněné kompozity a další) [14].

Nanovlákněný scaffold dokáže svými vlastnostmi napodobit ECM. Ve chrupavce a v pojivové tkáni kůže je ECM pórovitá, proto scaffold vyrobený elektrostatickým zvlákňováním je vhodný proto náhradu kůže nebo chrupavky. Buňky jsou ve tkáni v kontaktu s extracelulární matrix, která je tvořena ze sítě proteinů o velikosti nanometrů a glykosaminoglykanů. Interakcí mezi buňkami a ECM se mohou modulovat buněč-

né aktivity jako je migrace, proliferace, diferenciace a genová exprese¹⁰. Scaffold může tedy fungovat jako dočasná ECM pro regeneraci tkáně, dokáže poskytnout trojrozměrný prostor pro buňky *in – vitro*. Díky průměrům nanovláken, které jsou mnohem menší než buňky, jsou buňky schopné se organizovat kolem vláken a migrovat [15].

Hlavním významem elektrostatického zvlákňování pro biomedicínské aplikace je tkáňové inženýrství. Nanomateriály mají větší plochu pro pohlcování proteinů a také mají více vazebných míst pro receptory buněčné membrány, jak je vidět na obrázku 5. Správný výběr materiálu závisí na typu scaffoldu, požadovaných mechanických vlastnostech a také typu tkáně. Nanovláknenné materiály nabízejí vhodnější prostředí pro množení buněk [16].



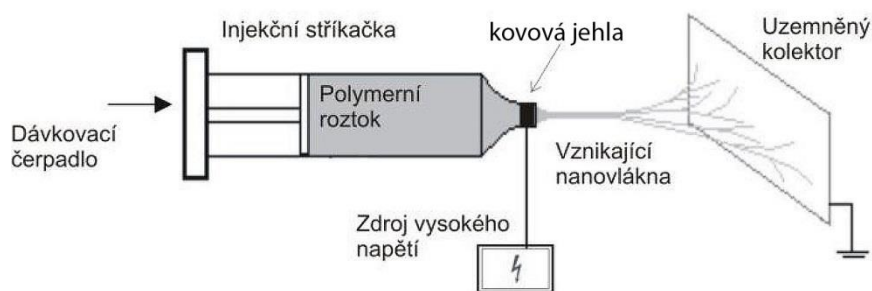
Obrázek 5 Znárodnění prorůstání buněk vybranými materiály [5]

Elektrostatické zvlákňování může být provedeno z jehly - trysky (viz obrázek 6), z tyčky anebo z povrchu válečku. Všechny tyto možnosti mají společné to, že musí být přítomen zdroj vysokého napětí, rozpuštěný polymer a uzemněný kolektor, který zachytává nanovláknna. Pro vznik vlákna je důležité zvolit vhodný polymer a rozpouštědlo. Vzhled vlákna je ovlivněn okolní teplotou, vlhkostí, vzdáleností elektrod, napětím a vodivostí vlákenné kapaliny. Dají se vytvářet vlákna z biodegradabilních polymerů jako jsou například chitosan, kolagen, polymer kyseliny mléčné nebo polykaprolakton, které jsou využitelné v tkáňovém inženýrství. Zvlákňováním lze ovlivnit jejich orientaci, mo-

¹⁰ genová exprese – proces ukládání informací, uložená informace je převedena v reálné existující buněčnou strukturu nebo informaci.

hou být v jednom směru nebo ve více směrech. Pomocí orientace vláken lze ovlivnit orientaci růstu buněk [15].

Princip výroby nanovláken spočívá v tom, že z kapky polymeru procházejícího elektrostatickým polem s napětím až 50 kV se z roztoku tvoří vlákna, která se pak následně zachytávají na kolektor. Na konci trysky jehly se vytvoří Taylorův kužel, dojde k deformaci kapky do kónického tvaru, ze kterého vycházejí vlákna a zároveň dochází k odpaření rozpouštědla [17].



Obrázek 6 Zvlákňování z trysky [6]

Taylor v roce 1969 studoval tvar kapky polymeru, která se vytváří na špičce jehly. Došel k závěru, že působením napětí na kapku polymeru dostane tvar kužele z jehož vrcholu jsou vymršťována vlákna polymeru. Taylorův kužel vzniká vyrovnáváním povrchového napětí polymeru elektrostatickými silami. Zvýšením napětí dojde ke změně tvaru kapky, ze které vlákna polymeru vycházejí [18].

3 BIOLOGICKY ROZLOŽITELNÉ POLYMERY POUŽÍVANÉ PRO VÝROBU TKÁŇOVÉHO NOSIČE

Výběr vhodného materiálu pro zhotovení tkáňového nosiče ovlivňuje biodegradabilita a biokompatibilita. Je to klíčový faktor pro rozvoj tkáňového inženýrství a následnou lékařskou aplikaci. Biologicky rozložitelné polymery mají velkou řadu výhod v oblasti zdravotnictví. Uplatnění získávají hlavně v tkáňovém inženýrství. Využití nalézají i jako nosič léčiv s postupným uvolňováním účinné látky [19]. Syntetické materiály disponují dobrými mechanickými vlastnostmi, přírodní polymery jsou zase díky složení tělu bližší. Přírodní polymery mají obecně lepší biokompatibilitu, a proto jsou vhodnější pro lidský organismus. Scaffoldy jsou vyvíjeny z materiálů různých vlastností, aby však bylo možné převést přírodní biopolymer na nanovlákná pomocí elektrostatického zvlákňování, je to obvykle obtížnější než ze syntetického polymeru.

Hlavním mechanismem degradace v živých organismech je hydrolýza. Hydrolyzovaný polymer je rozštěpen na menší části a v důsledku toho degraduje. Štěpení je ovlivněno jeho složením. Aby se materiál mohl použít v lékařství, musí být kvalifikován jako biomateriál. Takový to materiál musí splňovat celou řadu požadavků. Zda je materiál biokompatibilní rozhodují spíše produkty štěpení než samotný polymer [20, 13].

Mezi biologicky rozložitelné polymery, které se rozpouští ve vodě a v tělních tekutinách patří želatina, dextriny a polyethylenglykol. Do skupiny biologicky rozložitelných a nerozpustných polymerů patří chitosan nebo kolagen. Dalšími členy této skupiny jsou polyurethan (používá se jako tkáňové pojivo), polyestery (významným zástupcem této skupiny je polykaprolakton), kyselina polylaktidová (= kyselina polymléčná) a kyselina polyglykolová [21]. V řadě aplikací rekonstrukční chirurgie našly tyto polymery své využití. Získání nových vlastností je možné kombinací dvou polymerů. Výsledkem je pak materiál, který disponuje vlastnostmi obou polymerů. Kombinace různých materiálů jsou stále zkoumány [12].

3.1 Vybrané biologicky rozložitelné přírodní polymery

Přírodní biologicky rozložitelné polymery představují přirozeně vyskytující se polymery v přírodě, získávají se z obnovitelných zdrojů. Hlavními zástupci této skupiny přírod-

ních polymerů jsou - kolagen, želatina, albumin, chitosan (CS) a nebo také škrob. Přírodní biologicky rozložitelné polymery se mohou zkráceně nazývat biopolymery. Tyto biopolymery jsou cíleně vytvářeny během růstového cyklu ve všech organismech. Příkladem může být chitin (z něho se vyrábí chitosan), získává se z ulit mořských korýšů. Pro svůj přírodní původ mají tendenci být snadno biologicky rozložitelné. Hlavní nevýhodou je mnohdy obtížná dostupnost a nestabilita v kvalitě. Kvalita je ovlivněna podmínkami vzniku a ty nejsou nikdy stejné (chitosan, nikdy nelze vyrobit úplně stejný). Většina z nich je obtížně zpracována, než se získá žádaný produkt.

Přírodní biologicky rozložitelné polymery:

- kolagen – základní stavební jednotka pojivových tkání, používá se pro výrobu tkáňových nosičů
- želatina – pro svoje biokompatibilní a biodegradabilní vlastnosti má velmi dobré předpoklady pro použití v regenerativní medicíně
- celulóza – nanovlákná z ní připravená jsou zajímavým materiálem v oblasti krytů ran, a to jak pro vnější poranění, tak pro ošetření vnitřních ran při chirurgických zákrocích
- chitosan – používá se pro výrobu tkáňových nosičů a pro uvolňování léčiv

[21]

3.1.1 Chitosan

Jedná se o významný přírodní polymer. Získává se deacetylací¹¹ z chitinu, který se nachází v ulitách mořských korýšů nebo v buněčných stěnách některých hub. Jedná se o dostupný lineární polysacharid, který je biokompatibilní, netoxický, biologicky rozložitelný s anti mikrobiální aktivitou a kladným nábojem.

V době výroby chitosanu se těžko předvídají jeho vlastnosti, proto současný přístup spočívá v analýze složení výsledného produktu a vlastností. Charakteristika chitosanu je velice důležitá, ale není jednoduchá. Chitosan není nikdy stejný, protože se jedná o přírodní produkt, nikdy nelze zajistit, aby byl vždy stejný se stejnými vlastnostmi. To je důvod, proč výrobci udávají především viskozitu polymeru než jeho molekulovou hmotnost. Chitosan je také špatně rozpustný, s výjimkou kyselého prostředí. Jeho roz-

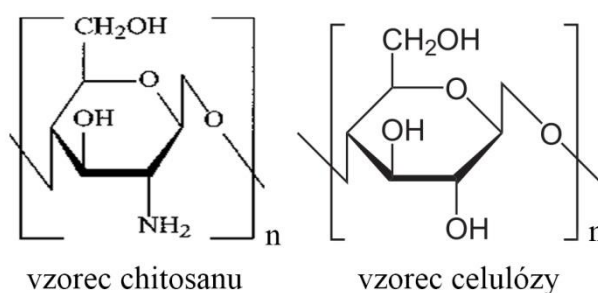
¹¹ deacetilaze chitinu je odstranění acetylové skupiny, odebrání acetylové skupiny CH₃CO z cílového proteinu

pustnost je možná v roztoku s pH nižším než 6. K rozpuštění stačí slabá kyselina. Jako rozpouštědlo chitosanu lze použít například kyselinu mravenčí [22].

Vhodnými způsoby zpracování pro výrobu scaffoldu je například freeze-drying nebo elektrostatické zvlákňování. Je dokázáno, že porézní struktura z těchto procesů poskytuje buňce vyhovující prostředí pro proliferaci. Chitosan interaguje s negativně nabitým nábojem molekul, například s bílkovinami, glykosaminoglykany nebo nukleovými kyselinami v roztoku. S nimi může být zpracován v gel, vlákno nebo film [23].

Vzhledem k vlastnostem je chitosan vhodným kandidátem pro výrobu scaffoldů, které mají nahradit poškozené nebo chybějící tkáň. Hlavní předností je jeho antibakteriální účinek. Zvláknit chitosan samotný je zcela nemožné kvůli vysoké viskozitě roztoku. Příliš viskózní roztok je obtížně zvláknitelný, protože vysoká viskozita brání v překonání elektrického pole a proto elektrostatické zvlákňování nemůže být úspěšné. Z toho to důvodu je snaha chitosan směšovat s dalšími vhodnými polymery určenými pro tkáňové inženýrství, aby roztok bylo možné elektrostaticky zvláknit. Jelikož chitosan vykazuje malou pevnost, směšováním se tato vlastnost může zlepšit [24].

Chitosan je svým strukturním vzorcem velice podobný celulóze. Tak jako chitin (z něhož se chitosan získává), který se nachází ve skořápkách hmyzu a korýšů, tak i celulóza vyskytující se ve stěnách rostlin, představuje důležitý polysacharid. Nepatrný rozdíl ve strukturním vzorci je vidět na obrázku 7.



Obrázek 7 Vzorec chitosanu a celulózy

1.1 Vybrané biologicky rozložitelné syntetické polymery

Biologicky rozložitelné syntetické polymery mají řadu výhod oproti přírodním biologicky rozložitelným polymerům. Jednou z hlavních výhod je vysoká mechanická pevnost. Je možné modifikovat rychlost rozkladu. Lze kontrolovat jejich vlastnosti (pevnost, biodegradabilitu, porozitu, mikrostrukturu). U syntetických polymerů je možné funkčně

modifikovat povrchové vlastnosti biomateriálu [20]. Významnou skupinou biologicky rozložitelných polymeru jsou polyestery. Mají dlouhou historii použití jako syntetický biologicky odbouratelný materiál. Nejvýznamnějšími zástupci jsou například polymléčná kyselina (PLA), polyglykolová kyselina (PGA), kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové (PLGA) a polykaprolakton (PCL). Dalším používaným polymerem je například polyethylenglykol (PEG). Tyto polymery našly v rekonstrukční chirurgii své využití v řadě aplikací [20].

Syntetické biologicky rozložitelné polymery:

- PEG – vhodný pro použití v tkáňovém inženýrství
- PLA a PGA – materiály jsou vhodné jako nosiče léčiv pro řízené uvolňování, kryty ran a také jako tkáňové nosiče
- PLGA – je to kopolymer PLA a PGA, jeho využití v praxi je podobné
- PCL – kombinací s jiným biodegradabilním polymerem lze využít různé rychlosti biodegradability při řízeném uvolňování léčiva. Jeho hlavní využití se našlo také jako tkáňový nosič v tkáňovém inženýrství.

[20,21]

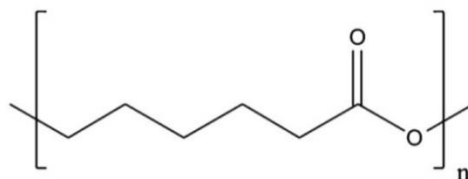
3.1.2 Polykaprolakton

Polykaprolakton je semikrystalický polyester s nízkou teplotou tání (60°C). Rozpuštěním ve vhodném rozpouštědle dojde k rozbalení řetězců polymeru. Jako vhodné rozpouštědlo lze zvolit chloroform nebo kyselinou octovou. Výběr rozpouštědla závisí na požadavcích výsledného scaffoldu.

PCL je biokompatibilní a zároveň biodegradabilní polymer využitelný v medicíně například pro výrobu chirurgických nití, jako nosič léčiv nebo jako materiál pro výrobu scaffoldu pro buněčný implantát. Nevýhodou tohoto materiálu je relativně dlouhá resorpce¹² dočasných implantátů. V první fázi rozkladu polymeru probíhá pouze hydrolytická degradace implantovaného materiálu, která trvá v závislosti na jeho hmotnosti řádově roky [25]. Biologická degradace je možná díky podobnosti chemické struktury s konstrukcí tuků a olejů využitelných mikroorganismy jako zdroje uhlíku. Díky biokompatibilitě je jeho využití možné v oblasti zdravotnictví – pro řízené uvolnění léků, zdravotnická lepidla, scaffoldy pro tkáňové inženýrství a ortopedické odlitky. Jed-

¹² resorbce – uvolnění a vstřebávání

ná se o univerzální polymerní materiál, který umožňuje snadné zpracování [26]. Na obrázku 8 je znázorněn vzorec polykaprolaktonu.



Obrázek 8 Vzorec polykaprolaktonu

Tento polymer je biologicky odbouratelný, může tvořit kopolymery se škroby či jinými látkami, díky této možnosti se z něj stává velmi zajímavý materiál. Díky přítomnosti esterových vazeb v makromolekulách se dokáže přizpůsobit nebo být rozložen vlivem biologického faktoru – bakteriemi, plísněmi, kvasinkami nebo houbami. Rozklad je možný tedy různými druhy mikroorganismů vyskytujících se běžně v přírodě. PCL je dále významný pro svoji biokompatibilitu s živým organismem, z toho to důvodu bylo jeho využití směřováno do oblasti biomedicíny.

Hlavní nevýhodou PCL je jeho dlouhá degradace. Dříve se používal jako nosič léčiv, ale na základě dlouhodobé degradace byl nahrazen jinými polymery. V současné době se dostává do popředí právě díky tkáňovému inženýrství [27].

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4 VÝROBA TKÁŇOVÉHO NOSIČE SMĚSI PCL/CS ELEKTROSTATICKÝM ZVLÁKŇOVÁNÍM

V této kapitole se popisuje výroba tkáňového nosiče s cílem nalezení nejnižší vhodné koncentrace PCL pro zvláknění směsi PCL/CS. Po nalezení vhodné koncentrace PCL se provede výroba nanovláknenné vrstvy směsi PCL/CS ve vybraných koncentracích pro biologické testování.

4.1 Použité chemikálie

- Kyselina octová (CH_3COOH) 99% – firma PENTA
- Kyselina mravenčí (HCOOH) 98% – firma PENTA
- Polykaprolakton – Mn 45 000, firma Sigma-Aldrich chemistry
- Chitosan – Chitosan 5, firma Wako Pure Chemical Industrie

4.2 Použitá zařízení

Viskozimetr

Pro důkaz stárnutí roztoků byl použit viskozimetr značky Thermo Scientific typu HAAKE RotoVisco 1 se senzorem C35/1°Ti.

Lineární pumpa

Pro elektrostatické zvláknění byla použita lineární pumpa značky KD Scientific typu KDS-100.

Nanospider

Zvláknění samotného polykaprolaktonu pro biologické testování probíhalo na zařízení NANOSPIDER o sériovém označení NS 1WS500U. Toto zařízení je od firmy Elmarco.

Rastrovací elektronový mikroskop (SEM)

Pro získání snímků jednotlivých vzorků byla použita rastrovací elektronová mikroskopie FEI COMPANY PHENOM. Vzorky byly potaženy tenkou vrstvou zlata a poté vloženy do rastrovacího mikroskopu.

4.3 Použité metody pro zhodnocení nanovláknenné vrstvy

4.3.1 Měření průměrů vláken - Program NIS Elements AR

Pro změření průměrů vláken byl použit Programu NIS Elements AR. Průměry vláken byly měřeny ze SEM snímků, které musely být kalibrovány na základě zvětšení snímku. Výsledkem měření byla průměrná, minimální a maximální hodnota a směrodatná odchylka. Vláknina pro měření byla vybírána v celé ploše obrazu. Průměry vláken byly vyhodnocovány ze 100 měření. U snímků vláken s výskytem defektů, bylo provedeno měření jejich poloměrů. Množství měřených defektů záviselo na počtu jejich výskytu. Pro vyhodnocení průměrné velikosti poloměru defektů se dělalo maximálně 100 měření a změřen kontaktní úhel pomocí SeeSystemu.

4.3.2 Měření kontaktního úhlu

Pro další zhodnocení nanovláknenné vrstvy, byla metoda měření kontaktního úhlu. Měření bylo provedeno pomocí SeeSystem - Surface Energy Evaluation Systému. Jedná se o zařízení a software, který se použil k určení hydrofilních/hydrofobních vlastností vrstvy. Celý proces by snímáný pomocí kamery a výpočty úhlu probíhaly na základě snímání v počítači. K testování byla použita voda, která se kapátkem aplikovala na povrch materiálu.

4.3.3 FTIR spektroskopie a mikroskopie

FTIR spektroskopie a mikroskopie byla použita pro ověření přítomnosti chitosanu po odstranění kyselin promytím materiálu. FTIR je Infračervená spektroskopie s Fourierovskou transformací. Při měření byla použita metoda ART. Je to metoda totálně zeslabené reflexe, k níž byl použit jednodrazový krystal z Ge. Měřeno bylo reflexní technikou za použití detektoru chlazeného kapalným dusíkem.

4.4 Výroba nanovláknenné vrstvy ze směsi polykaprolaktonu s chitosanem

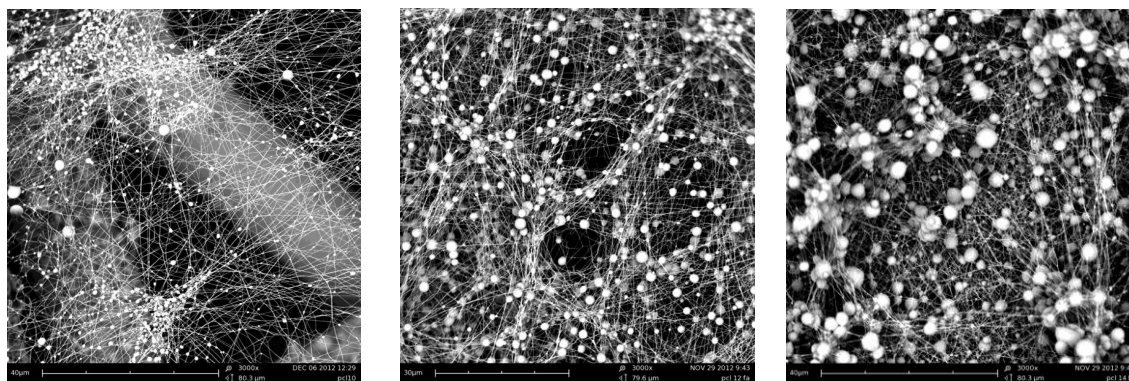
4.4.1 Příprava roztoků

Před každým zvlákňováním bylo potřeba připravit roztok polymrů. Polymer polykaprolakton je v základním pevném stavu ve formě granulátu, polymer chitosan je v pevném stavu ve formě prášku. Polymery byly v kyselinách rozpouštěny zároveň. Pro lepší rozpouštění bylo použito míchací zařízení s magnetickým míchadlem. Aby bylo možné roztok použít pro zvlákňování, nechaly se polymery rozpouštět 24 hodin.

4.4.2 Elektrostatické zvlákňování polykaprolaktonu

Elektrostatické zvlákňování PCL bylo provedeno v koncentraci 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18% a 20%-ního roztoku. Jako rozpouštědlo byla zvolena kyselina mravenčí a octová. Důvodem použití kyselin k rozpuštění bylo následné směsování PCL s CS, ten je rozpustný jen v kyselém prostředí. Pro rozhodnutí, která kyselina bude mít vyšší poměr v roztoku, bylo provedeno zvlákňování PCL s rozpouštěcím systémem kyseliny octové a kyseliny mravenčí v poměru 7:3 a 3:7.

Pomocí lineární pumpy KD Scientific typu KDS-100, bylo provedeno elektrostatické zvlákňování z jehly o délce 45 mm s průměrem 0,9 mm. Vlákna se zvlákňovala na spun-bond gramáže 6,035 g/m². Účelem zvlákňování bylo hledání nejnižší možné koncentrace PCL, při které by vznikala nanovláknna. Ze zvlákněných vrstev byly pořízeny SEM snímky na rastrovacím elektronovém mikroskopu FEI COMPANY PHENOM. Na obrázcích 9 a 10 je ukázka vybraných SEM snímků zvlákněného PCL v obou rozpouštěcích systémech (kyselina octová : kyselina mravenčí 3:7 a 7:3).



10% PCL (zvětšení 3000x)

12% PCL (zvětšení 3000x)

14% PCL (zvětšení 3000x)

Obrázek 9 Ukázka SEM snímků zvlákněného PCL v koncentraci 10%-14%, zvlákňovací systém kyselina octová : kyselina mravenčí (3:7)

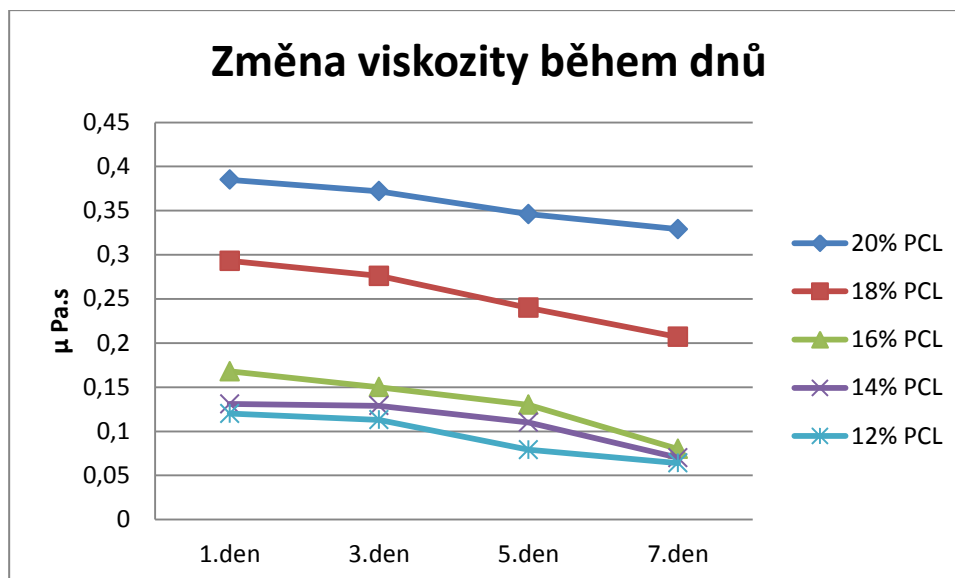


10% PCL (zvětšení 2000x) 12% PCL (zvětšení 2000x) 14% PCL (zvětšení 2000x)

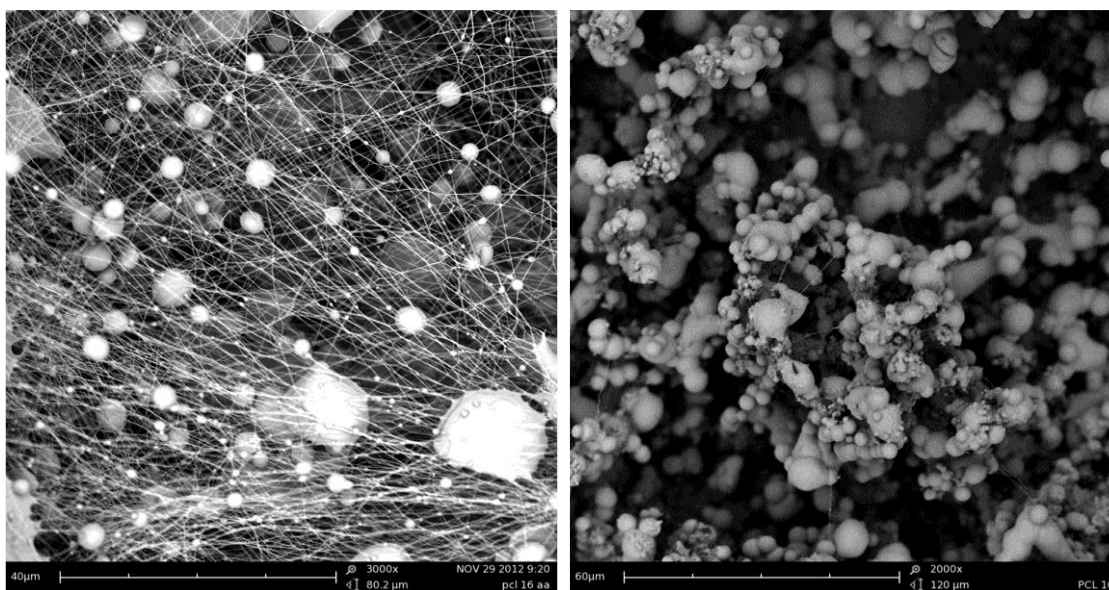
Obrázek 10 Ukázka SEM snímků zvlákněného PCL v koncentraci 10%-14%, zvláknovací systém kyselina octová : kyselina mravenčí (7:3)

Z pořízených snímků z rastrovací elektronové mikroskopie lze usoudit, že vlákna na PCL rozpuštěného v kyselině octové a mravenčí v poměru 7:3 je možné tvořit už od 14% PCL. Nižší koncentrace PCL v tomto rozpouštěcím systému neumožní vytvořit nanovlákna, vznikají vlákna silná s mnoha defekty. Při poměru kyseliny octové a mravenčí 3:7 vznikají nanovlákna už roztoku 10% PCL. Vlákna mají na první pohled menší velikost defektů než u rozpouštěcího systému 7:3 (kyselina octová : kyselina mravenčí). Tyto defekty se s vyšší koncentrací polymeru v roztoku zvětšovaly. Nedocházelo jen ke změně velikosti, ale i nárůstu jejich množství. Na základě pořízených SEM snímků bylo rozhodnuto, že pro další zvláknování bude použit rozpouštěcí systém kyseliny octové a mravenčí v poměru 3:7. Přehled SEM snímků zvlákněných koncentrací 8% - 20% PCL obou rozpouštěcích systémů je v příloze A Parametry zvláknování všech koncentrací z řady 8%-20% PCL jsou v příloze B.

Během hledání vhodné koncentrace a poměru rozpouštěcího systému roztoku bylo zjištěno, že dochází ke stárnutí roztoku. Roztok starší dva a více dnů bylo obtížné zvláknit. Pro ověření degradace polymeru byla měřena viskozita roztoků pomocí viskozimetru se senzorem C35/1°Ti v rozmezí 7 dnů. Měření ukázalo, že viskozita polymerního roztoku klesá, viz graf 1. Vynesená hodnota v grafu představuje průměrnou naměřenou hodnotu při 200 otáčkách ze třech opakovaných měření. V grafu jsou vyneseny hodnoty 12%, 14%, 16%, 18% a 20% PCL zvlákněného z poměru rozpouštěcího systému kyseliny octové : kyseliny mravenčí 7:3. Na obrázku 11 je vidět srovnání 16% PCL zvlákněného z roztoku starého jeden den a pět dní. Důsledkem stárnutí roztoku docházelo k depolymerizaci. Řetězce polymeru se v roztoku rozpadaly, a proto viskozita klesala.



Graf 1 Změna viskozity zvláknovacího roztoku PCL během dnů (rozpuštěcí systémem 7:3 - kyselina octová : kyselina mravenčí)



a) 16% PCL, jeden den starý roztok – zvětšení 3000x

b) 16% PCL, pět dnů starý roztok – zvětšení 2000x

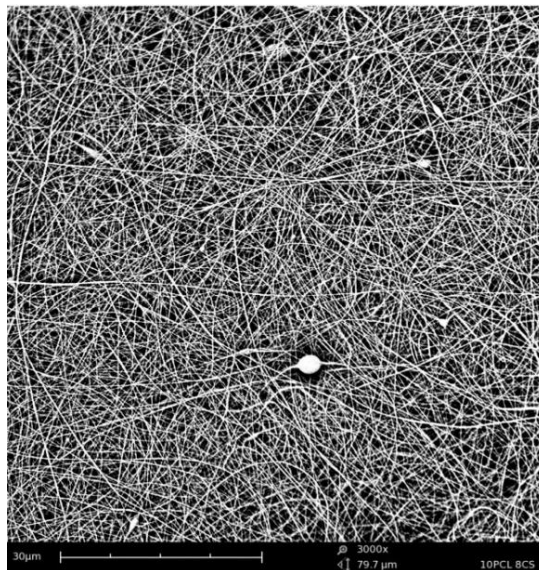
Obrázek 11 Porovnání různě starých zvlákněných roztoků - 16% PCL

Bohužel se nepodařilo z jehly elektrostaticky zvláknit použitelný 10% PCL rozpuštěný v kyselinách pro porovnání se směsí PCL/CS při biologickém testování. Materiál se po zvláknění rozpadal. Z tohoto důvodu byl použit pro zhodnocení viability buněk 18% polykaprolakton vyrobený na zařízení Nanospider. Polymer byl zvláknován na spun-bond gramáže 6,775 g/m². Rozpuštědlem byl zde chloroform s acetonem v poměru 8:2.

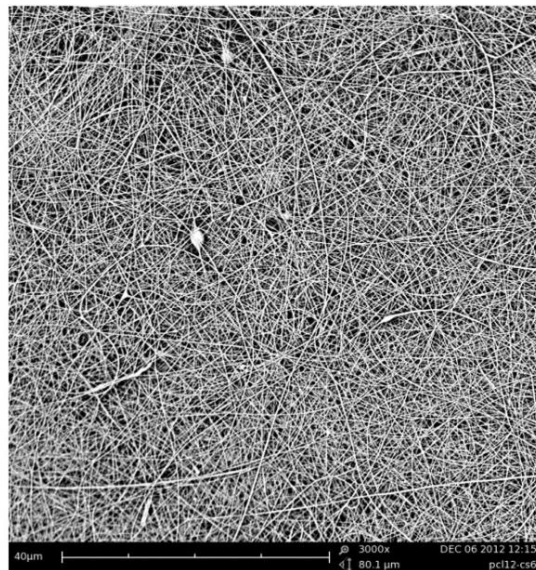
4.4.3 Elektrostatické zvlákňování směsi polykaprolaktonu a chitosanu

Ze zvlákněné řady 8-20% PCL byly vybrány koncentrace s vyhovujícími výsledky – výskyt malých defektů a co nejnižší koncentrace polymeru v roztoku, který je zvlákňitelný. Nejnižší koncentrace PCL, při které vznikala vlákna, byla 10%, 12%, 14% a 16%, velikost defektů byla přijatelná. Na základě tohoto výsledku byly zvoleny čtyři různé koncentrace výsledných směsí: 10% PCL + 8% CS, 12% PCL + 6% CS, 14% PCL + 4% CS, 16% PCL + 2% CS. Směs PCL/CS byla rozpouštěna v kyselině octové a mravenčí v poměru 3:7.

Zvlákňování směsi bylo prováděno z jedné jehly. Ze zvlákněných nanovrstev byly pořízeny SEM snímky (viz obrázky 12, 13). Na první pohled je vidět, že defekty, které obsahovala vlákna samotného PCL, zcela vymizely. Jejich přítomnost byla pouze patrná u vzorku s nejnižším zastoupením CS. Z důvodu přítomnosti defektů byl materiál 16% PCL + 2% CS vyřazen pro použití při biologickém testování. Vlákna vzniklá zvlákňováním 10% PCL + 8% CS, 12% PCL + 6% CS a 14% PCL + 4% CS byla homogenní a proto byly tyto nanovlákněné vrstvy zvoleny pro testování. Parametry zvlákňování těchto materiálů jsou v příloze C.

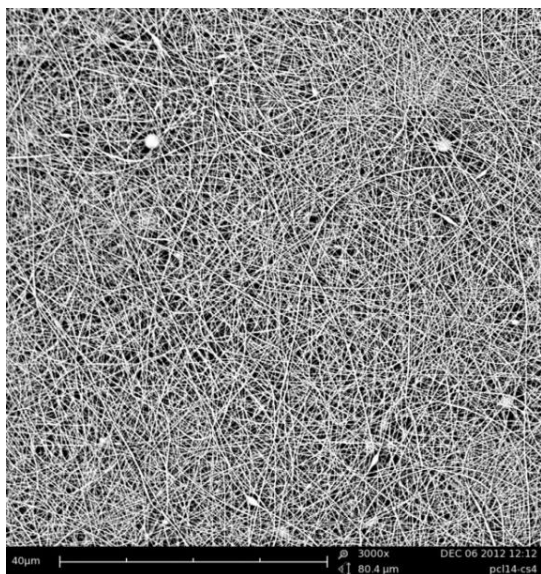


10%PCL + 8% CS (zvětšení 3000x)

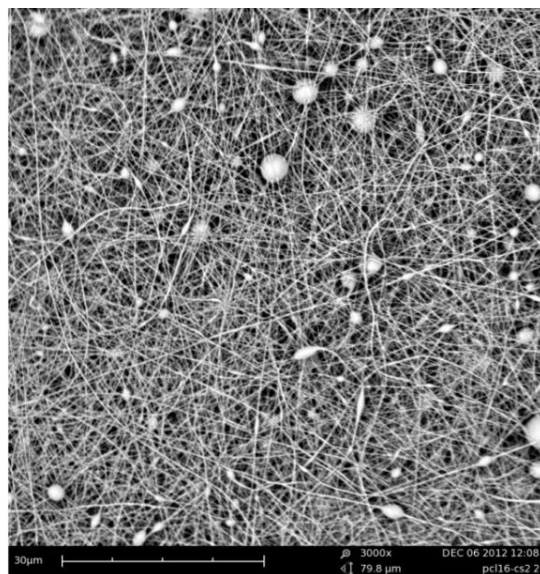


12% PCL + 6% CS (zvětšení 3000x)

Obrázek 12 SEM snímky zvlákněného PCL/CS z roztoku kyseliny octové a kyseliny mravenčí v poměru 3:7



14% PCL + 4% CS (zvětšení 3000x)



16%PCL + 2% CS

Obrázek 13 SEM snímky zvlákněného PCL/CS z roztoku kyseliny octové a kyseliny mravenčí v poměru 3:7

Výroba nanovláknenných vrstev pro biologické testování byla provedena pomocí systému čtyř jehel (viz obrázek 14). Účelem navýšení počtu jehel bylo očekávané zrychlení výroby nanovláknenné vrstvy. Tento systém byl bohužel nevhodný, k očekávanému zrychlení nedošlo, spíše ke zpomalení. Bylo to způsobeno s největší pravděpodobností malou vzdáleností jednotlivých jehel od sebe. Odstraněním dvou jehel uprostřed se proces výroby zrychlil.



Obrázek 14 Systém dvou a čtyř jehel

Pro zhodnocení jednotlivých nanovláknenných vrstev byly změřeny průměry vláken a kontaktní úhel materiálu. Přehled výsledků průměrů vláken jsou v příloze D. Vyhodnocení kontaktního úhlu a průměrů vláken je v kapitole 7.

5 ANALÝZA TKÁŇOVÉHO NOSIČE

Tato kapitola se zabývá vymýváním zbytkových kyselin ze zvlákněných vrstev 10% PCL + 8% CS, 12% PCL + 6% CS a 14% PCL + 4% CS. Pro ověření přítomnosti obou polymerů se použila FTIR spektroskopie a udělal se mapping vrstvy.

5.1 Použité chemikálie

- Destilovaná voda
- Ethanol 60% - 100%
- Amoniak 28% - Chemapol Lachema

5.2 Použitá zařízení

FTIR spektroskopie a mikroskopie

Vzorky byly analyzovány analytickou metodou infračervené mikroskopie ART – FTIR. K měření byl použit přístroj značky Nicolet iN10 a iZ10.

pHmetr

Pro měření pH při vymývání kyselin by použit pH metr pH 700 od firmy EUTECH. Přesnost měřicího přístroje je +/- 0,002.

Systém čištění vody

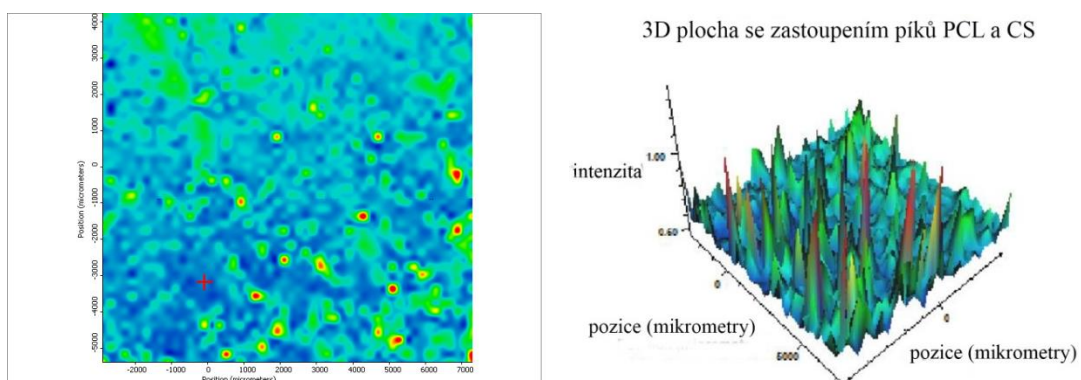
Pro pročištění destilované vody bylo použito zařízení značky Millipore. Jedná se o typ Simplicity Ultrapure, typ I ultra čisté vody pro laboratoře. Čištění destilované vody bylo pomocí filtru s póry o velikosti 0,05 μm .

5.3 Ověření přítomnosti chitosanu pomocí ART-FTIR spektrometrie

Z důvodu přítomnosti zbytkových kyselin v materiálu bylo provedeno promývání vzorků. Pro zjištění přítomnosti chitosanu po promytí v nanovlákněné vrstvě směsi PCL/CS byla použita FTIR mikroskopie. Vzorek nanovlákněné vrstvy se připevnil na hliníkovou podložku a snímala se spektra reflexní metodou. Plocha, ze které byla vytvořena mapa rozložení složek ve vzorku (viz obrázek 15), měla velikost cca 1 x 1 cm. Velikost apertury byla 200 x 200 μm s krokem 200 μm . Snímek mapy byl pořízen ze vzorku 10% PCL + 8% CS. Nejvyšší hodnoty představují místa, kde převládá PCL (červená barva v

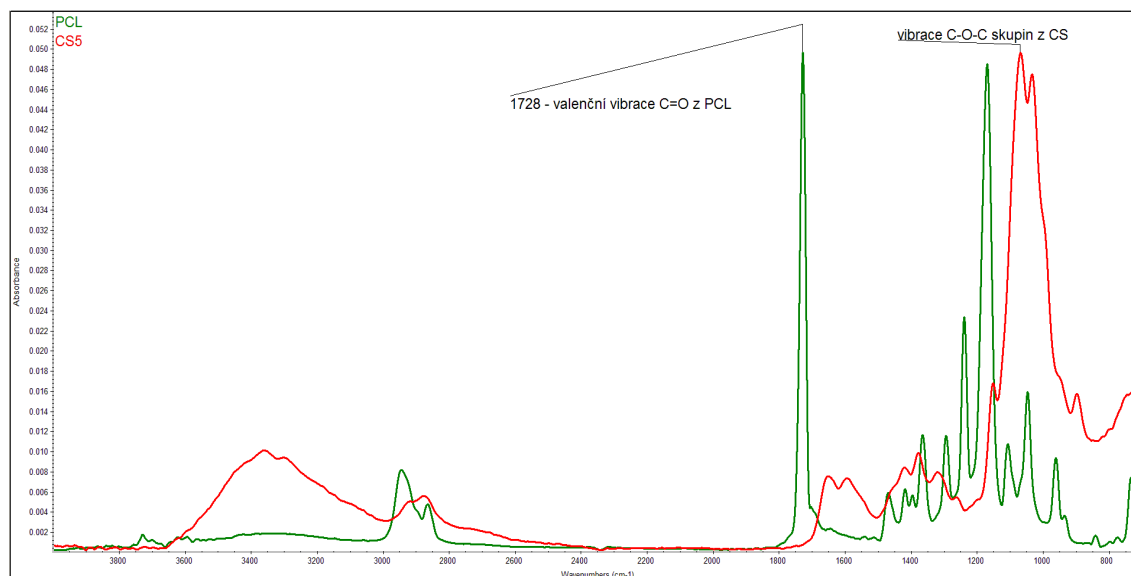
Elektrostatické zvláknění směsi polykaprolaktonu a chitosanu a jeho biologické testování

mapě) a nejnižší, kde je zastoupení CS (modrá barva). Zelená barva v mapě indikuje místa s přibližně průměrným zastoupením obou složek. V celém vzorku má nicméně dominantní zastoupení PCL. Chitosanu je velmi málo, ale přítomen je. Procentuální zastoupení složek nelze touto metodou zjistit, protože není k dispozici potřebná kalibrace (několik vzorků se známým zastoupením složek). Závěr se dá říct, že z mappingu lze usoudit, že rozložení PCL a CS je rovnoměrné. Místa, kde je odlišné složení jsou takřka rovnoměrně rozložena v ploše a jsou vzhledem k velikosti vzorku malá.



Obrázek 15 Mapa nepromytého PCL/CS a zobrazení 3D plochy pásů PCL a CS

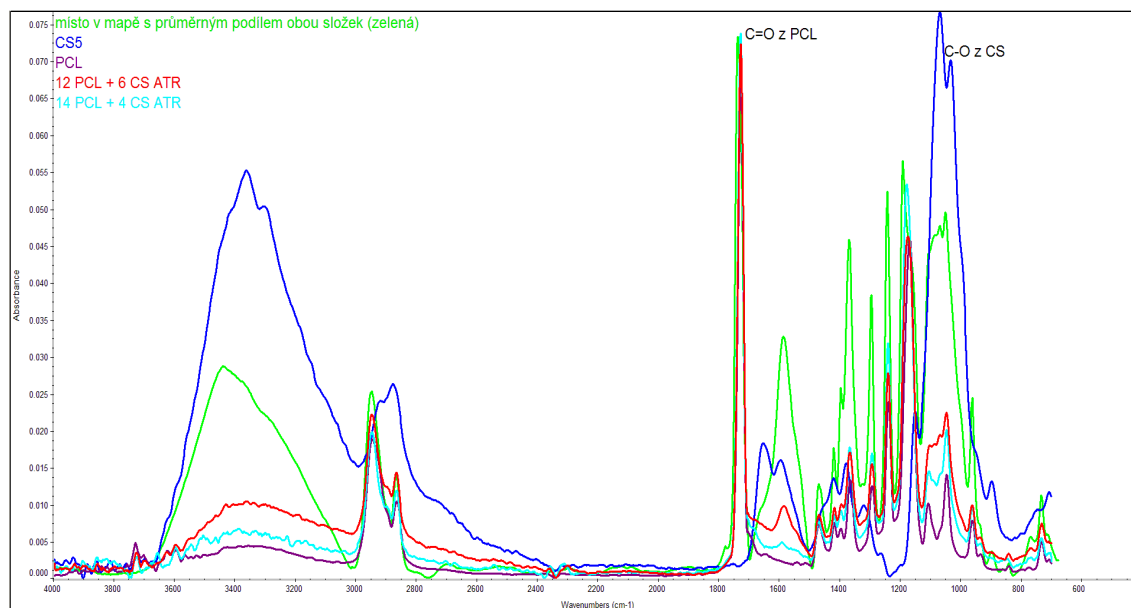
Na obrázku 16 jsou znázorněna spektra čistého PCL a CS, která byla pro porovnání změřena. Z těchto spekter byly vybrány pro každou složku pásy, které jsou pro danou látku charakteristické a nevyskytují se ve složce druhé. Intenzity těchto pásů byly dány do poměru ve smyslu PCL/CS a ze získaných hodnot byla vytvořena mapa rozložení jednotlivých složek. Byl použit pás valenční vibrace C=O z PCL a pás valenčních vibrací C-O vazeb z chitosanu.



Obrázek 16 Základná spektrum polykaprolaktonu a chitosanu

Vzorky zvlákněné směsi s podílem složek 12% PCL + 6% CS a 14% PCL + 4% CS byly analyzovány vzhledem k časové náročnosti pouze bodově na vzorkovacím prostoru pro makrovzorky. Byla použita FTIR spektrometrie, ART technika s krystalem z Ge. Každý vzorek byl proměřen na 5 místech, v obrázku 17 je uvedeno průměrné spektrum (jednotlivá spektra se téměř nelišila). Přítomnost obou složek (PCL a CS) byla potvrzena přítomností charakteristických pásů pro dané látky.

Všechna spektra jsou srovnána na stejnou intenzitu pásu valenční vibrace C=O z PCL, intenzita pásů příslušejících chitosanu je porovnávána vůči tomuto pásu. Je zřejmé, že intenzita, tedy i množství chitosanu ve vzorcích koreluje s množstvím chitosanu ve směsi použité ke zvláknění.



Obrázek 17 Znázornění spekter 12%PCL+6%CS a 14%PCL+4%CS

5.3.1 Vymývání zbytkových kyselin z nanovláknenné vrstvy směsi PCL/CS různými roztoky

Zbytkové kyseliny v materiálu sice neovlivní biologické testování *in vitro* z důvodu výměny média během testování, ale pro použití tkáňového nosiče *in vivo* je důležité najít způsob, jak daný materiál zbavit kyselin. Pufrovací systémy organismů mají pouze omezenou kapacitu. Přítomnost kyselin v nanovláknenné vrstvě může vyvolat nežádoucí reakce *in vivo*. Nebezpečí při vymývání kyselin je rozpuštění chitosanu, které by bylo v tomto případě nežádoucí. K rozpuštění může dojít, právě když má roztok pH nižší než 6, jak se uvádí v článku Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation [28]. V tabulce 3 jsou znázorněny roztoky, jimiž byly vzorky promývány, u každého je uvedena jeho hodnota pH.

Tabulka 3 pH roztoků pro promývání tkáňových nosičů směsi PCL/CS

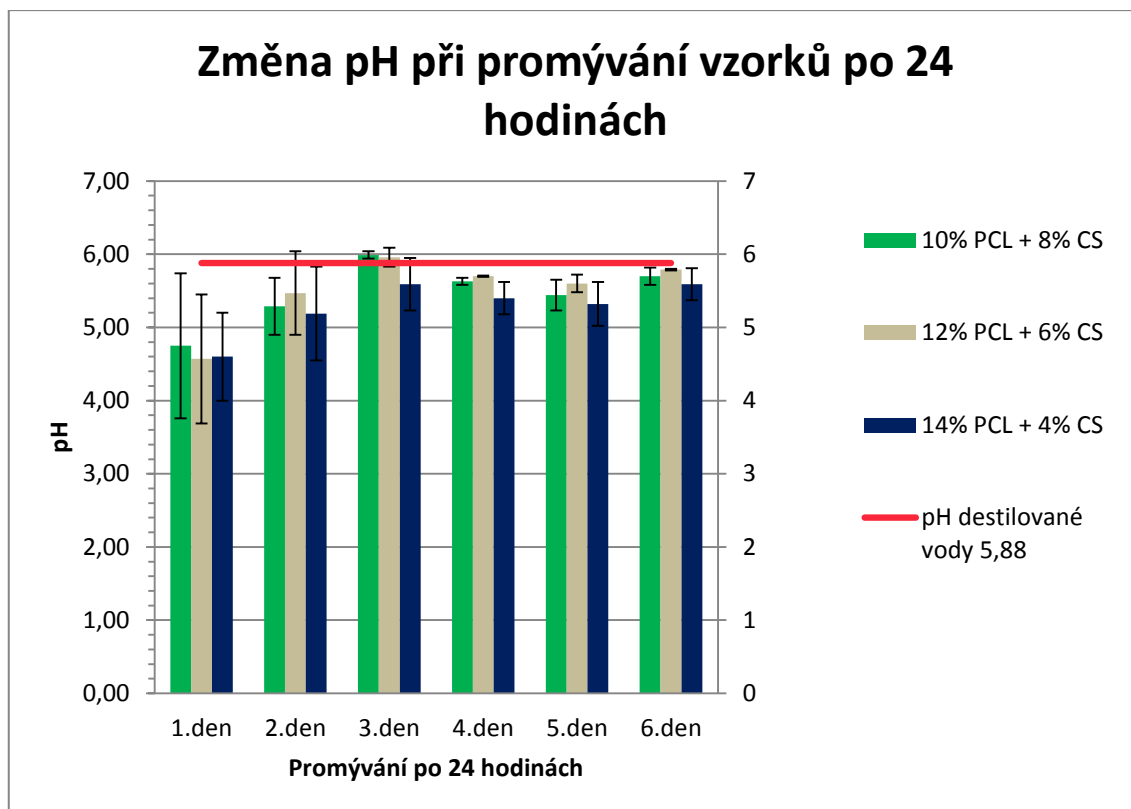
| Druh vymývacích roztoků | pH |
|-----------------------------|-------|
| zásobní destilovaná voda | 5,88 |
| pročištěná destilovaná voda | 6,29 |
| ethano 60% | 5,51 |
| ethanol 70% | 5,80 |
| ethanol 80% | 6,12 |
| ethanol 90% | 6,59 |
| ethanol 96% | 6,81 |
| ethanol 100% | 7,27 |
| amoniak 7% | 11,97 |
| amoniak 10% | 12,25 |
| amoniak 14% | 12,40 |

5.3.1.1 Promývání destilovanou vodou

Jako prvním roztokem pro vymytí kyselin byla použita destilovaná voda, jejíž hodnota pH byla 5,88. Vzorky 10% PCL + 8% CS, 12% PCL + 6% CS a 14% PCL + 4% CS o velikosti 1,5 cm x 1,5 cm a váze cca 0,001 g byly louhovány 24 hodin v 1,5 ml destilované vody. Před každou výměnou roztoku bylo změřeno pH, výsledky měření jednotlivých vzorků jsou vidět v tabulce 4.

Tabulka 4 Změna pH jednotlivých vzorků

| | | | | | | | |
|-----------------|-----|------|------|------|------|------|------|
| 10% PCL + 8% CS | Den | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. |
| | pH | 4,75 | 5,29 | 5,99 | 5,63 | 5,44 | 5,70 |
| 12% PCL + 6% CS | Den | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. |
| | pH | 4,57 | 5,47 | 5,96 | 5,70 | 5,60 | 5,79 |
| 14% PCL + 4% CS | Den | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. |
| | pH | 4,60 | 5,19 | 5,59 | 5,40 | 5,32 | 5,59 |

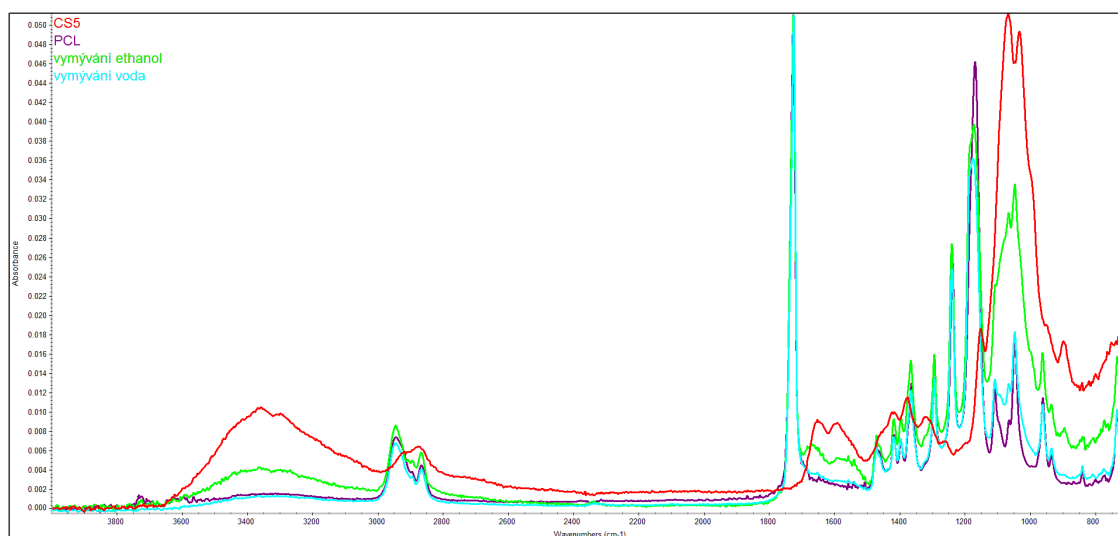


Graf 2 Změna pH po 24 hodinách

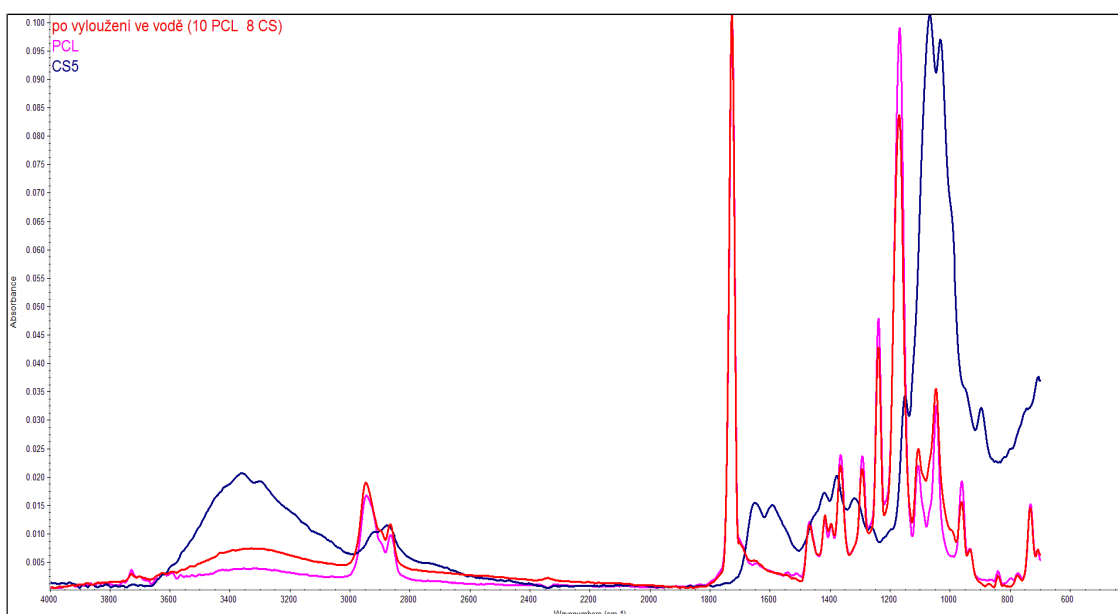
V grafu 2 jsou znázorněny hodnoty pH všech vzorků. Hodnota 5,88 představuje pH destilované vody, kterou byly vzorky promývány. Z grafu je vidět, že pH i po 6 výměnách destilované vody není ustálené. Hodnoty jsou kolísavé, ale přesto blízké původní hodnotě pH 5,88. Hodnota pH z prvního měření je velice nízká, vzniká nebezpečí rozpuštění chitosanu. Z toho to důvodu byla voda pročištěna pomocí systému pro pročištění destilované vody značky Millipor. Po pročištění se pH destilované vody zvýšilo z 5,88 na 6,29.

Rozpuštění chitosanu po louhování v roztoku bylo experimentálně zjišťováno pomocí FTIR. Pro toto testování byl použit jen vzorek 10% PCL + 8% CS, protože detekce chitosanu u ostatních vzorků po promytí byla na hranici možné detekce chitosanu ve vzorku. Nanovlákná vrstva směsi PCL/CS se ponořila do roztoku na 30 minut a 24 hodin. Louhování probíhalo v pročištěné destilované vodě, po usušení se vzorek pomocí FTIR porovnal k hodnotám získaného pásu chitosanu. Jak je vidět na obrázku 18 a 19, tak z výsledků vyplývá, že chitosan byl rozpuštěn už po 30-ti minutovém louhování v pročištěné destilované vodě. pH se změnilo z 6,29 na 5,65. Výsledek po 24 hodinovém louhování je velice podobný, chitosan není přítomný. pH destilované vody se po 24

hodinách snížilo z 6,29 na 5,15. Z důvodu nepřítomnosti chitosanu v nanovlákně vrstvě už po 30 minutách, byla metoda pro vymytí kyselin pomocí destilované vody zamítnuta.



Obrázek 18 FTIR PCL/CS po 30 minutovém louhování

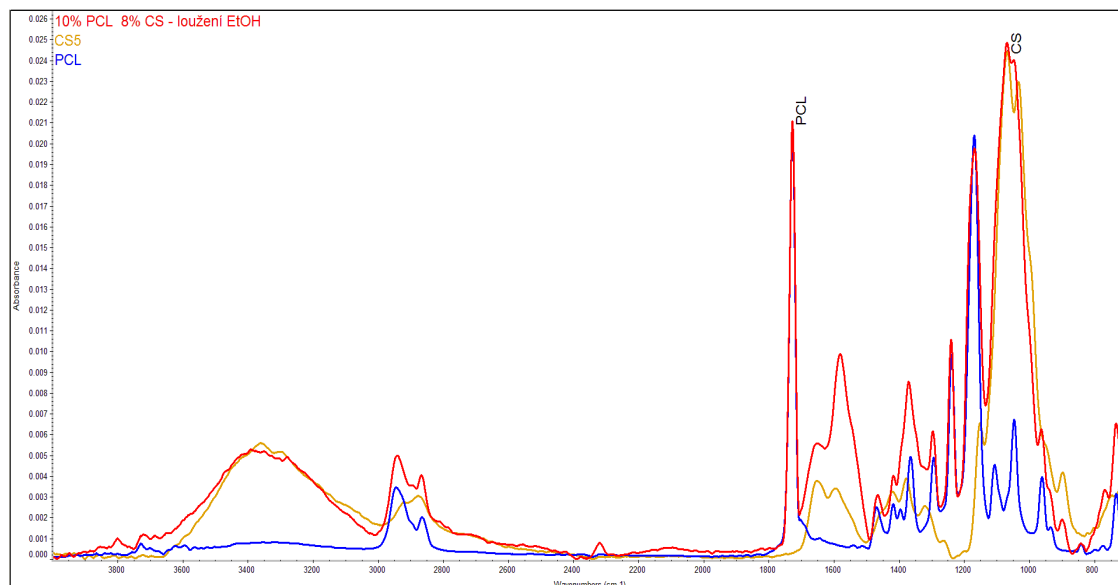


Obrázek 19 FTIR PCL/CS po 24 hodinách

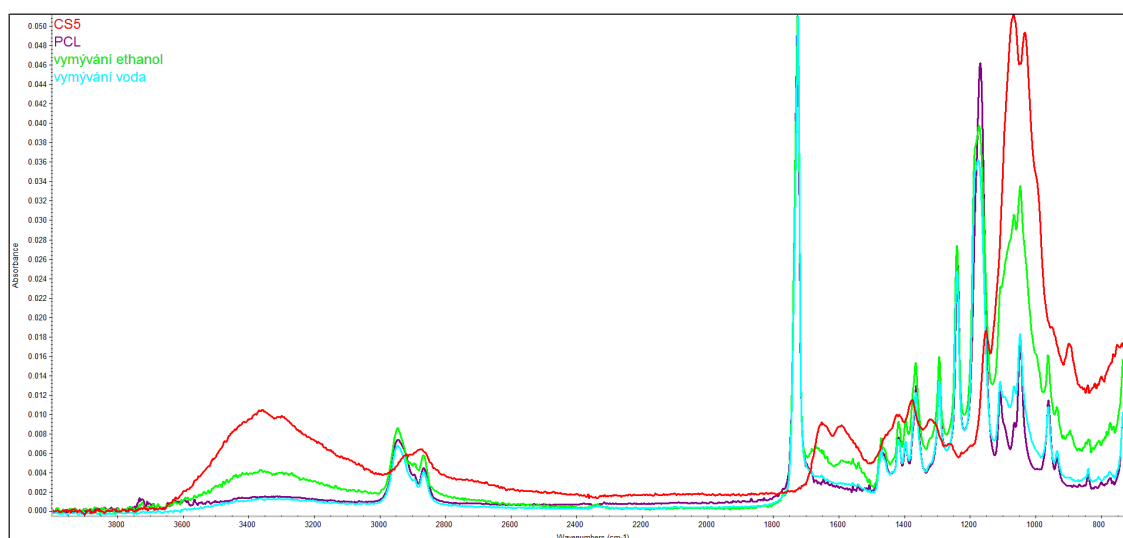
5.3.1.2 Promývání 70 % ethanolem

Na základě neúspěchu s vymytím kyselin pomocí destilované vody, byl zvolen 70% ethanol. Tentokrát nebylo provedeno několik vymývání po 24 hodinách, jako u předchozího testování, ale jen 30-ti minutové a 24 hodinové louhování vzorku v roztoku. Po vysušení bylo opět změřeno FTIR spektrum ATR technikou. Výsledkem louhování by-

lo, že po 30 minutách kdy došlo ke změně pH z 5,8 na 5,17 byl chitosan přítomen (viz obrázek 20). Po 24 hodinách došlo ke změně pH z 5,8 též na 5,17. Na obrázku 21 je vidět, že přítomnost chitosanu po 24 hodinách (vykreslení tyrkysovou barvou) je o něco menší, ale přesto lze zhodnotit, že je přítomen.



Obrázek 20 FTIR PCL/CS po 30 minutách loužení v 70% ethanolu



Obrázek 21 FTIR PCL/CS po 24 hodinách

5.3.1.3 Promývání 96% ethanolem

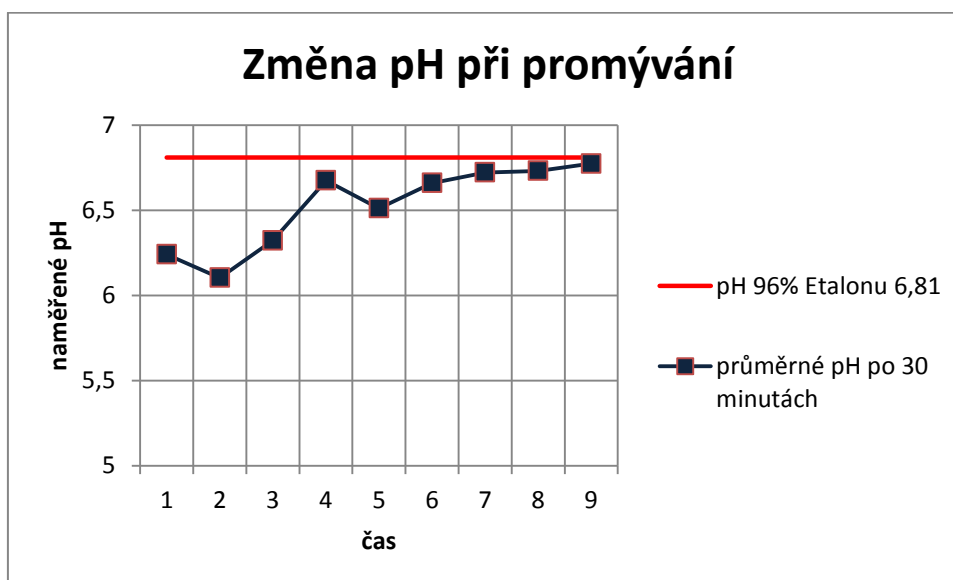
Jelikož pH roztoku je po 30 minutovém louhování vzorku pořád stále nízké, riziko rozpuštění chitosanu při odstraňování kyselin stále hrozí. Z tohoto důvodu byl k promytí vybrán 96% ethanol, jehož pH je 6,81. U promývaného materiálu bylo provedeno 9 výměn 96% ethanolu po 30-ti minutách dokud nedošlo k ustálení pH. Z tabulky 5 lze

usoudit, že dochází k postupnému vymývání kyselin navyšováním pH po louhování vzhledem k původní hodnotě pH. Při desátém promytí došlo k ustálení pH. Pro kontrolu byl vzorek ponechán v roztoku 24 hodin, ke změně pH nedošlo.

Tabulka 5 Změna pH po 30 minutách

| Promývání | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 8. | 9. | 10. |
|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| pH | 6,24 | 6,10 | 6,32 | 6,68 | 6,28 | 6,51 | 6,66 | 6,72 | 6,73 | 6,81 |

Naměřené hodnoty pH byly vyneseny do grafu (viz graf 3) v porovnání s hodnotou pH 96% ethanolu. Z grafu se dá usoudit, že již po 4-tém promytí byla hodnota pH ustálená. Pro ověření byla provedena 4 promytí nového vzorku po 30 minutách a následným 24 hodinovým louhováním v 96% ethanolu a v destilované vodě. Destilovaná voda byla zvolena z důvodu větší reakce pH na přítomnost možných zbytkových kyselin. Výsledky pH uvedené v tabulce 6 vypovídají, že pH po 4 promytí není ustálené, proto pro promytí vzorků v experimentu bude provedeno minimálně devět krát. U vzorků bylo pak změřeno FTIR spektrum ATR technikou. Jak je vidět na obrázku 22, chitosan je po 4 promytí přítomen. Vínová barva znázorňuje stav chitosanu po 4 promytích a 24 hodinách v 96% ethanolu, tmavě modrá barva znázorňuje stav chitosanu po 4 promytích a 24 hodinách v destilované vodě - dochází k rozpuštění chitosanu.

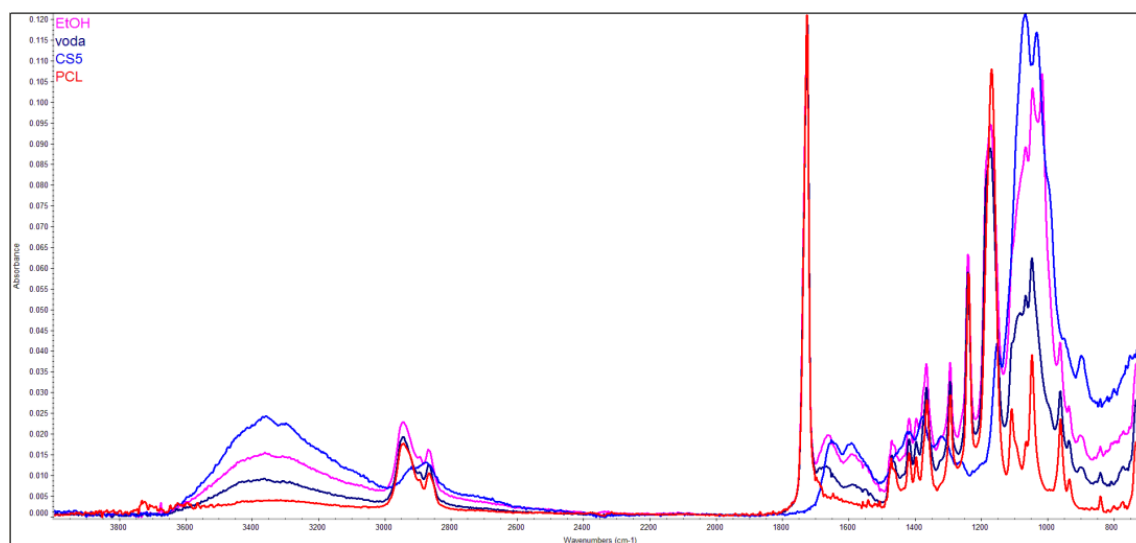


Graf 3 změna pH při promývání 96% ethanolem

Tabulka 6 Ověření pH po 4 promytí

| Promývání | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-----------|------|------|------|------|
| pH | 5,94 | 5,90 | 5,93 | 6,21 |

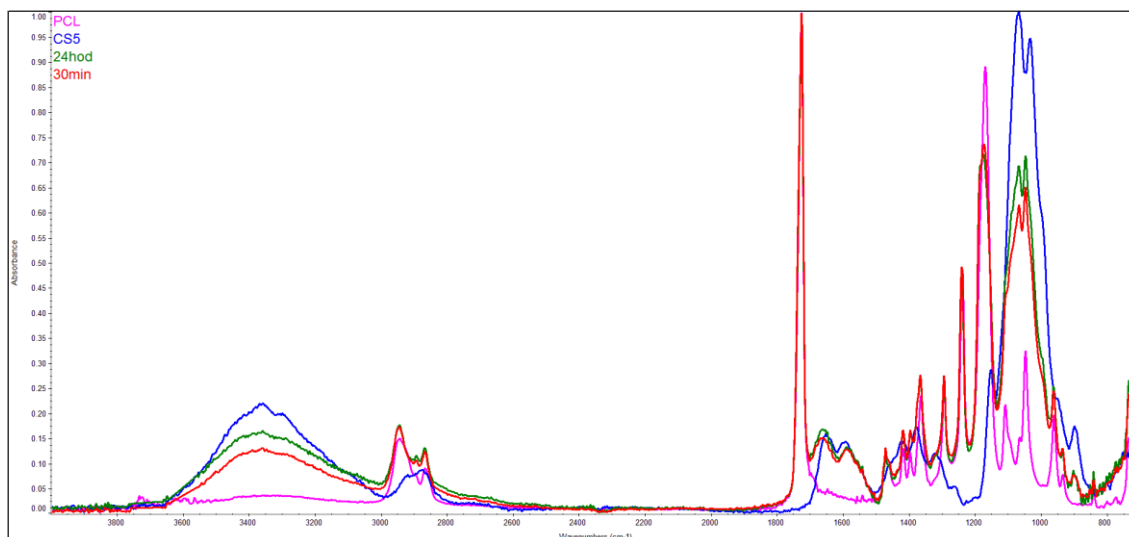
| | |
|--|---------|
| 4 promytí v 96 % ethanolu + 24 hodinové louhování v destilované vodě | pH 5,78 |
| 4 promytí v 96 % ethanolu + 24 hodinové louhování v 96 % ethanolu | pH 6,25 |



Obrázek 22 FTIR po 4 promytí a 24 hodinovém louhování

5.3.1.4 Promývání 100% ethanolem

I když 96% ethanol představoval zatím nejvhodnější roztok pro vymytí kyselin z nanovlákněné vrstvy, bylo provedeno 30-ti minutové a 24 hodinové louhování ve 100% ethanolu. Po vysušení bylo změřeno FTIR spektrum ATR technikou. Po 30-ti minutách došlo ke změně pH ze 7,27 na 6,12, po 24 hodinách došlo ke změně pH ze 7,27 na 6,10. Na obrázku 23 je vidět ze spekter, že po 30-ti minutách (červená barva) a 24 hodinách (zelená barva) promývání je chitosan z velké části přítomen.



Obrázek 23 FTIR pro vymývání 100% ethanolem

5.3.1.5 Promývání zředěným roztokem amoniaku

Jako další možný způsob vymytí kyselin z materiálu byl zvolen amoniak v koncentraci 7, 10 a 14 %. Tento způsob promývání byl zvolen na základě článku. Ashleigh Cooper v článku *Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan–PCL fibers for nerve tissue regeneration* publikovaný v časopise *Carbohydrate Polymers* popisuje odstranění kyselin pomocí louhování v roztoku zředěného amoniaku pro neutralizaci [29]. Způsob vymytí kyselin spočíval v 5-ti minutovém louhování vzorku ve zředěném roztoku amoniaku a následném promývání v destilované vodě. Postupným promýváním v destilované vodě došlo po 9 promytí k ustálení pH (viz tabulka 7). U tohoto způsobu vymývání kyselin nebylo měřeno FTIR spektrum ATR technikou, protože pH nebylo pod hodnotou 6, nemohlo tedy dojít k rozpuštění chitosanu. I když se na první pohled zdát, že tento způsob by byl nejvhodnější pro odstranění kyselin ze vzorku, nastává zde ale problém toxicity po vyřešeném problému s kyselinami. Z tohoto důvodu byla tato metoda vymývání zamítnuta.

Tabulka 7 Výsledky pH z promývání vzorku amoniakem

| 5 minut louhování v 7% amoniaku s pH 11,97 a po té několikrát 15 min louhované v destilované vodě | | | | | | | | | |
|--|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|
| Promývání | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 8. | 9. |
| pH | 11,1 | 10,33 | 9,64 | 8,47 | 8,21 | 7,03 | 7,18 | 7,57 | 6,23 |
| 5 minut louhování v 10% amoniaku s pH 12,25 a po té několikrát 15 min louhované v destilované vodě | | | | | | | | | |
| Promývání | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 8. | 9. |
| pH | 11,38 | 10,66 | 9,76 | 9,10 | 8,65 | 7,91 | 7,74 | 7,36 | 6,9 |
| 5 minut louhování v 14% amoniaku s pH 12,40 a po té několikrát 15 min louhované v destilované vodě | | | | | | | | | |
| Promývání | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 8. | 9. |
| pH | 11,46 | 10,60 | 9,89 | 9,28 | 8,66 | 7,73 | 6,62 | 6,38 | 6,77 |

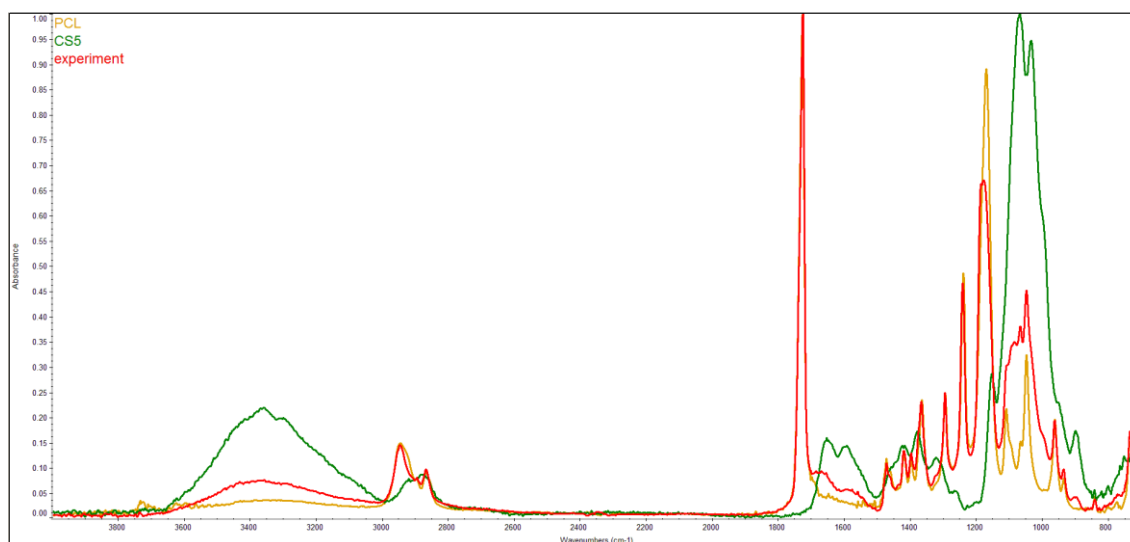
5.4 Odstranění kyselin z nanovláknenné vrstvy určené pro biologické testování

Vzorky 10% PCL + 8% CS, 12% PCL + 6% CS a 14% PCL + 4% CS o velikosti 10 cm x 10 cm a váze cca 0,065 g byly promývány v 25 ml 96 % ethanolu. I když 100 % ethanol vykazoval nejvyšší pH po 30 minutách a 24 hodinách (viz tabulka 8), přesto byl zvolen 96 % ethanol. Důvodem byly postačující výsledné hodnoty a také 96% ethanol představoval levnější variantu vymývání.

Celkem bylo provedeno 12 promytí, poté se pH ustálilo. Výsledky promývání všech třech vzorků jsou v příloze E. Na obrázku 24 je vidět výsledek FTIR spektra ATR techniky. Z velikosti pásů lze usoudit, že chitosan je po 13-ti promytím stále přítomen v materiálu, i když je jeho množství je o něco nižší než před promytím.

Tabulka 8 Přehled ve změnách pH při vymývání se zhodnocením

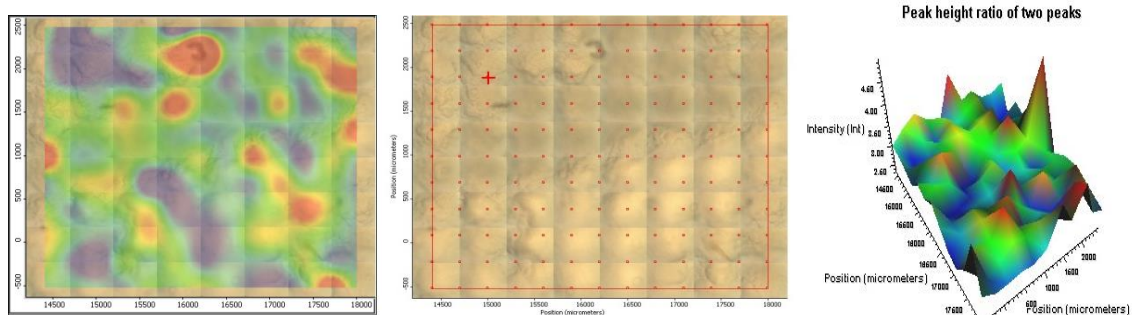
| Vymývací roz- tok | čas louho- vání | vstupní pH | pH po lou- hování | Změřené FTIR spektrum ATR technikou pro přítomnost CS | zhodnocení FTIR - PCL |
|---------------------------------|--------------------|---------------|----------------------|--|-----------------------------|
| Destilovaná voda z milliporu | 30 minut | pH 6,29 | pH 5,65 | dochází k vymytí - z části přítomen | přítomen |
| Destilovaná voda z milliporu | 24 hodin | pH 6,29 | pH 5,16 | nepřítomen | přítomen |
| 70% Ethanol | 30 minut | pH 5,66 | pH 5,17 | přítomen | přítomen |
| 70% Ethanol | 24 hodin | pH 5,66 | pH 5,15 | dochází k vymytí - spíše nepřítomen | přítomen |
| 96% Ethanol | 30 minut | pH 6,81 | pH 5,99 | přítomen | přítomen |
| 96% Ethanol | 24 hodin | pH 6,81 | pH 5,95 | dochází k vymytí - přítomen | přítomen |
| 100% Ethanol | 30 minut | pH 7,27 | pH 6,12 | dochází k vymytí - přítomen | přítomen |
| 100% Ethanol | 24 hodin | pH 7,27 | pH 6,10 | dochází k vymytí - přítomen | přítomen |



Obrázek 24 Přehled ve změnách pH při vymývání se zhodnocením

Ze vzorku 10% PCL + 8% CS zbaveného kyselin byla vytvořena mapa plochy pro zjištění plošného rozptýlení PCL a CS. Na obrázku 25 je znázorněno překrytí mi-
Elektrostatické zvlákňování směsi polykaprolaktonu a chitosanu a jeho biologické tes-
tování

kroskopického obrazu barevnou mapou rozložení složek a z toho vykreslené 3-D provedení pásů. Mikroskopický obraz je vytvořen zhruba ze středu vzorku o velikosti 1,5 x 1,5 cm. Měření bylo provedeno reflexní technikou na Al podložce přístrojem Nicolet iN10 za použití detektoru chlazeného kapalným dusíkem. Obraz znázorňuje závislost poměru intenzit pásu charakteristického pro PCL ($\text{C=O } 1739 \text{ cm}^{-1}$) a pásu charakteristického pro chitosan (1060 cm^{-1}) na pozici v mapě. Poměr intenzit bylo nutné použít proto, že na intenzitu pásů má vliv tloušťka, geometrie a další (vzorek nanovláken není rovný). Velká část vlivů se tímto potlačí. Poměr intenzit pásů je $A_{\text{PCL}}/A_{\text{CH}}$. Červená barva v mapě charakterizuje vyšší poměr, tedy ve prospěch PCL. Modrá je nejnižší poměr, v tomto vzorku je tedy o něco více chitosanu. Barevná škála postupuje od modré přes zelenou a žlutou k červené vzestupně. Absolutní hodnoty nelze bez standardů určit, lze jen určit čeho je "více" a "méně", o homogenitě to ale vypovídá.



Obrázek 25 Mapinng vzorku a 3D zobrazení pásů

6 BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ TKÁŇOVÉHO NOSIČE

6.1 Použité chemikálie

- DMEM – firma Lonza
- MTT – firma Sigma-Aldrich chemistry
- PBS – firma Lonza
- FBS – firma Lonza
- Antibiotika penicilin/streptomycin/amfotericin B – firma Lonza
- Methanol – firma Penta
- Ethanol – firma Penta
- Propidium jodid - firma Sigma-Aldrich chemistry
- Isopropanol – firma Penta
- EDTA/Trypsin - firma Sigma-Aldrich chemistry
- Glutaraldehyd – firma Sigma-Aldrich chemistry

6.2 Buněčný materiál

Pro in vitro testování byly použity buňky 3T3 – myší fibroblasty, 10. pasáž.

6.3 Použitá zařízení

Bürkerova komůrka

Slouží k přímému stanovení počtu buněk. Na základě výpočtu se určí počet buněk v 1 ml.

Spektrofotometr

Pro zhodnocení viability buněk pomocí MTT testu byl použit spektrofotometr od firmy BioTek typu ELx808. Všechny výpočty jsou prováděny automaticky, vyhodnocování dat je provedeno pomocí řídicího a analytického softwaru Gen5.

Invertovaný fluorescenční mikroskop

Pro fluorescenci a pozorování buněk byl použit invertovaný fluorescenční mikroskop NIB – 100F značky KRD. Snímky fluorescence buněk byly zachyceny pomocí programu Scope Image Plus.

Elektrostatické zvlákňování směsi polykaprolaktonu a chitosanu a jeho biologické testování

6.4 Použité metody

6.4.1 MTT test

Pro zjištění viability a proliferaci buněk nasazených na testovaných materiálech byl použit tzv. kolorimetrický test pro stanovení životnosti buněk – MTT test. Je to kvantitativní spektrofotometrická metoda, která analyzuje schopnost proliferace buněk, měří metabolické aktivity buněk. Tato metoda je založena na přeměně žlutého MTT na fialový nerozpustný formazan, který tvoří krystaly. Rozpuštění krystalů je možné v organickém rozpouštědle, například isopropanolem. Principem bylo změřit absorbanci roztoku získaného z rozpuštěných krystalů, které vznikly po přidání MTT do média. Na základě těchto roztoků se provedlo spektrometrické měření při vlnových délkách 570 a 650 nm. Získané hodnoty se zpracovaly v Excelu.

6.4.2 Fluorescenční mikroskopie

Tato metoda je založena na aplikaci fluorescenční sondy propidium jodid. U fluorescenční metody dochází k vazbě látek na složky buněčné hmoty, výsledkem je zesílení a posunutí spektra fluorescence. Dojde k posunu a posílení fluorescence v červené barvě. Pomocí této metody se dá zjistit plocha a velikost buněk na základě zpracování v programu pro obrazovou analýzu. Tato metoda je založena na aplikaci látky, která za běžných podmínek nedokáže proniknout neporušenými buněčnými membránami. Aby došlo k proniknutí, musí být porušená membrána buněk. Porušení membrány lze pomocí mraženého methanolu. U fluorescenční metody dochází k vazbě látek na složky buněčné hmoty, výsledkem je zesílení a posunutí spektra fluorescence. Sonda propidium jodid na sebe váže nukleové kyseliny. Po vazbě látky na nukleové kyseliny dojde k posunu a posílení fluorescence v červené oblasti spektra.

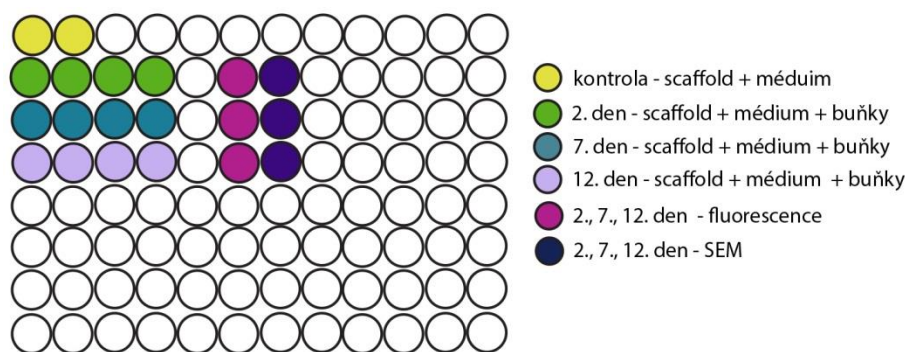
6.4.3 SEM

Pro získání SEM snímků tkáňových nosičů s nasazenými buňkami bylo důležité jejich zařezání v nanovlákněné vrstvě. Touto metodou se získají snímky pro vizuální posouzení prorůstání a množení buněk v nanovlákněných vrstvách.

6.5 In vitro testování

6.5.1 Příprava materiálu pro testování

Z 10% PCL + 8% CS, 12% PCL + 6% CS, 14% PCL + 4% CS a samotného PCL byly připraveny vzorky (kruhové o průměru 0,6 mm) v odpovídající velikosti jamek kulti-vační destičky. Pro každý materiál bylo potřeba připravit 20 vzorků – 12 pro MTT test, 3 na SEM, 3 na fluorescenci a 2 jako kontrola, viz obrázek 26. Pře nasazením buněk byl materiál sterilizován v 96 % ethanolu po dobu 30 minut. Po sterilizaci se vzorky v kulti-vační destičce přenesly do laminárního boxu kde se 2x propláchly v PBS pro od-stranění zbytku ethanolu. Na takto připravené vzorky se nasadilo 10^4 buněk v 200 μ l kompletního média (médium s FBS a antibiotiky). U každého vzorku byl jeden materiál kontrolní, na něj se buňky nenasazovaly, byl pouze v médiu. Takto nasazené scaffoldy byly inkubovány při 37°C po dobu 12 dnů. Aby buňky měly dostatek živin pro růst a množení, bylo médium vyměňováno 2x – 3x týdně dle potřeby.



Obrázek 26 Uspořádání vzorků v kulti-vační destičce

6.5.2 Příprava buněk

Kultivace buněk probíhala v kulti-vačních lahvičkách s médiem DMEM, do kterého bylo přidáno 10% FBS a 1% směsi antibiotik výsledného roztoku. Kultivace probíhala v in-kubátoru s 5% CO₂ při teplotě 37°C. Po vytvoření souvislé vrstvy buněk, která pokrýva-la dno kulti-vační lahvičky z 80%, bylo odsáto médium. Buňky byly propláchnuty PBS, ztrypsinizovány a naředěny v kompletním médiu. Ze získané buněčné suspenze se sta-novil počet buněk pomocí Bürkerovy komůrky. Scaffoldy odpovídající velikosti 96-jamkové destičky byly osázeny 10^4 buněk.

6.5.3 MTT test tkáňových nosičů

MTT test se prováděl po dvou, sedmi a dvanácti dnech. Ke každému testování byly po-užity čtyři vzorky, aby bylo možné statistické vyhodnocení.

Elektrostatické zvlákňování směsi polykaprolaktonu a chitosanu a jeho biologické tes-tování

Do sterilní 96-jamkové destičky se připravilo 150 μ l média + 50 μ l roztoku MTT pro každý testovaný vzorek. Scaffoldy určené pro testování se přenesly do tohoto roztoku. Přenesení scaffoldů do nových jamek se provádělo z důvodu zamezení měření viability buněk adherovaných na stěně jamky, byla tedy měřena pouze metabolická aktivita buněk na scaffoldu. Vzorky v médiu s MTT se vložily do inkubátoru na 4 hodiny při 37°C. Po uplynutí doby se odsálo médium s MTT a pro rozpuštění fialových krystalů se použil okyselený isopropanol. Po rozpuštění krystalů se isopropanol s rozpuštěnými krystaly odsál do nových jamek a změřilo se fialové zbarvení roztoku. Měření se provádělo pomocí spektrofotometrem od firmy BioTek. Naměřené hodnoty byly přeneseny do programu Excel a dále zpracovány.

Pro zjištění absorbance se hodnota při vlnové délce 570 nm odečetla od hodnoty při vlnové délce 650 nm. Z výsledků čtyř vzorků od jednotlivých materiálů se udělal průměr a směrodatná odchylka. Pro vyhodnocení se hodnoty vynesly do grafu s chybovými úsečkami.

Pro porovnání viability buněk testovaných materiálů se použil nepárový test shody dvou rozptylů – F-test. Podmínkou tohoto testu bylo, aby data byla nezávislá. Pomocí F-testu se ověřovalo, zda jsou rozptyly měření shodné. Na základě výsledků bylo pak stanoveno použití dvouvýběrového t-testu. Pro výpočet byla stanovena hladina statické významnosti $\alpha=0,05$. Pokud p-hodnota byla nižší než 0,05 - nulová hypotéza byla zamítnuta ve prospěch alternativní hypotézy. Výsledkem bylo, zda se rozptyly viability buněk v jednotlivých materiálech liší nebo neliší.

6.5.4 SEM tkáňových nosičů s buňkami

Po 2, 7 a 12 dnech byly vzorky určené pro SEM analýzu zafixováním v 2,5% glutaraldehyd v PBS (4°C, 20 minut). Po uplynutí doby se roztoky odsály. Vzorky použité pro SEM se po 20 minutách fixace daly promýt postupně v 5-ti minutových intervalech do 60%, 70%, 80%, 90% a 96% 100% ethanolu. Vysušené vzorky byly umístěny na terčík, poprášeny vrstvou zlata a analyzovány SEM. Zhodnocení získaných snímků je v kapitole 7.

6.5.5 Fluorescence buněk v tkáňovém nosiči

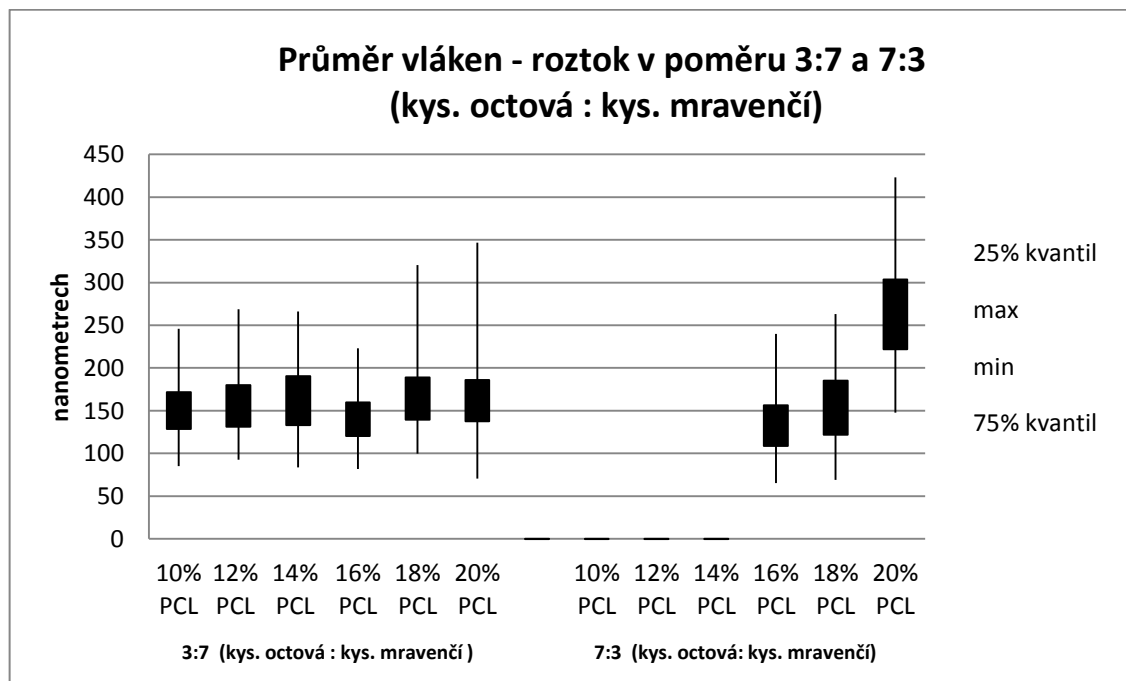
Vzorky s nasazenými buňkami pro fluorescenci se musely také zafixovat. Postup byl následující. Vzorky se přendaly do kultivační destičky s vymraženým methanolem a daly se na 20 minut do lednice.

Zafixované vzorky se propláchly PBS a poté se obarvily propidu jodidem. Methanolem se narušila buněčná membrána a díky tomu mohl propidu jodid proniknout do jader. Vzorky se po té se použily pro pozorování na invertovaném fluorescenčním mikroskopu. Pozorování bylo ve zvětšení 100x, pomocí programu Scope Image Plus se pořídily snímky buněk v tkáňovém nosiči. Pořízené snímky jsou zhodnoceny v kapitole 7.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

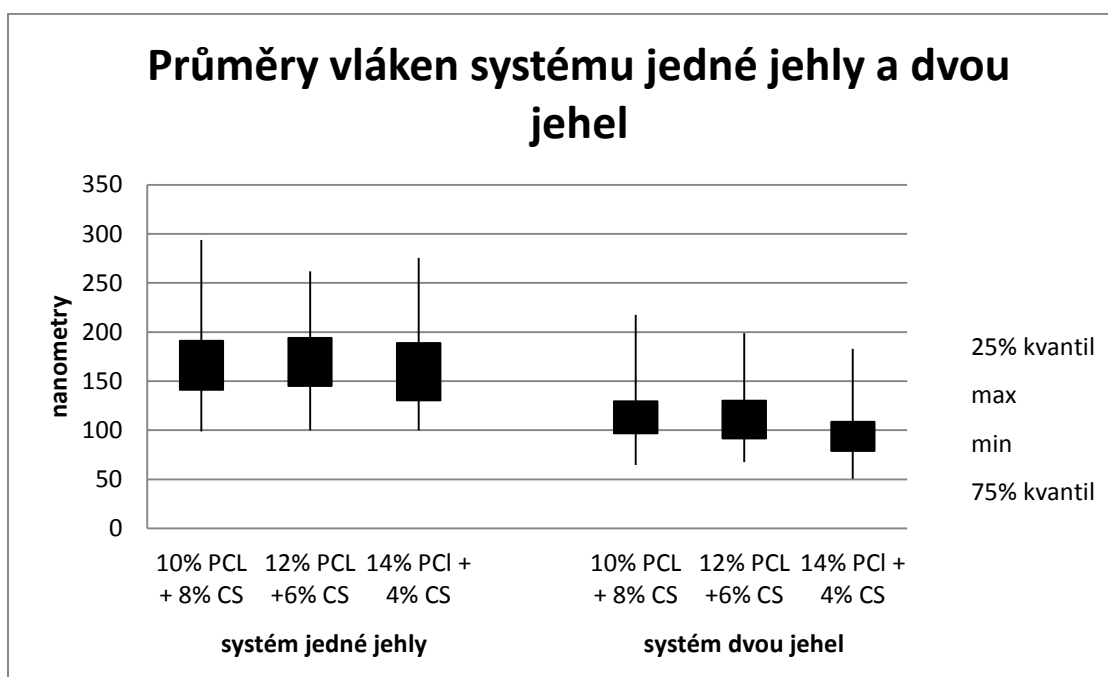
7.1 Průměr vláken

Na základě článku Polycaprolactone/chitosan blend nanofibres electrospun from an acetic acid/formic acid solvent system, kde byl hledán nejvhodnější poměr rozpouštěcího systému kyseliny octové a mravenčí pro zvláknění směsi PCL/CS, byly vybrány dva, které se použily pro zvláknování samotného polykaprolaktonu v různých koncentracích [30]. Účelem bylo nalézt nejnižší možnou koncentraci PCL, kterou lze zvláknit z kyselin. Výsledky zvláknování PCL s rozpouštěcím systémem kyseliny octové a kyseliny mravenčí v poměru 3:7 a 7:3 jsou uvedeny v grafu 4. Na základě výsledků zvláknování lze říci, že vhodným rozpouštěcím systémem je poměr kyseliny octové a mravenčí 3:7. Na první pohled je vidět, že vlákna vytvořena z roztoku s převahou kyseliny mravenčí vznikají už při 10% koncentraci PCL. Při této koncentraci došlo i k poklesu velikosti a množství výskytu defektů. Vlákna z roztoku s převahou kyseliny mravenčí vznikají až při 16% koncentraci PCL. Na základě těchto výsledků byl zvolen pro další zvláknování rozpouštěcí systém 3:7 - kyselina octová : kyselina mravenčí pro vytvoření tkáňového nosiče ze směsi PCL/CS.



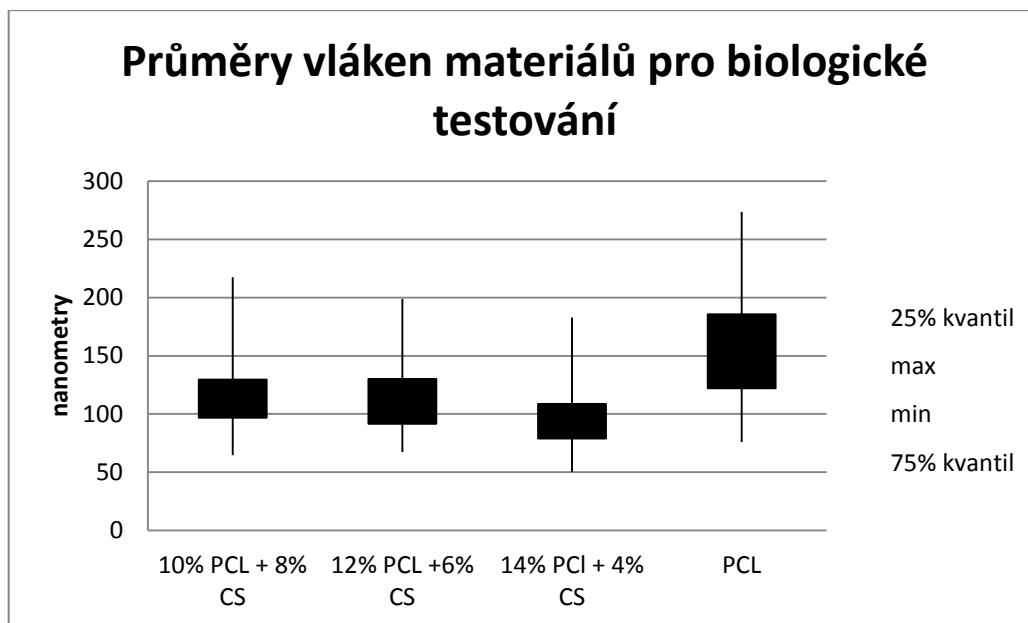
Graf 4 Průměry vláken – rozpouštěcí systém 3:7 a 7:3 (kyselina octová : kyselina mravenčí)

U dalšího porovnání vláken nezáviselo na koncentraci zvlákněné směsi PCL/CS, ale na systému zvláknování. Jak je vidět v grafu 5, zvláknováním směsi PCL/CS z jedné jehly vznikla vlákna silnější než při zvláknování směsi PCL/CS ze dvou jehel. Rozdíl průměru vláken je viditelný. Parametry zvláknování u obou systémů byly podobné. S největší pravděpodobností docházelo k ovlivnění zvláknovacích trysek. Materiál zvlákněný systémem dvou jehel byl použit pro biologické testování.



Graf 5 Porovnání průměrů vláken vzhledem k systému zvláknování

V grafu 6 jsou znázorněny všechny průměry vláken zvolených koncentrací pro testování. Průměrné hodnoty průměrů vláken PCL/CS jsou velmi podobné, oproti tomu polykaprolakton má průměrné hodnoty průměrů vláken o něco vyšší.



Graf 6 Průměry vláken materiálů použitých pro biologické testování

V článku *An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone*, kde jsou porovnávána vhodná rozpouštědla pro polykaprolakton lze vyčíst, že průměry vláken PLC jsou různé. Velikost průměru se liší vzhledem ke zvolenému rozpouštěcímu systému. Zvlákněná vlákna PCL rozpuštěného v chloroformu mají průměr vláken 4173 ± 257 nm, než vlákna PCL rozpuštěného v rozpouštěcím systému kyseliny octové : kyseliny mravenčí, vlákna mají průměr 266 ± 39 nm [31]. V článku *Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution* se řeší zvláknění chitosanu z kyselin. Zvlákněním 7% chitosanu z kyselin vnikají vlákna s průměrem 130 nm [32]. Kombinací PCL/CS byla očekávána vlákna s nižším průměrem a bez defektů. Výsledky z měření průměrů vláken a SEM snímků očekávání potvrdily.

7.2 Kontaktní úhel

Měřením kontaktního úhlu nanovlákných vrstev bylo zjištěno, že se časem mění (viz tabulka 9). Výsledné úhly vypovídají, že všechny materiály ve směsi PCL/CS jsou hydrofilní. Polykaprolakton samotný vyšel podle výsledků měření jako hydrofobní. Jak již bylo zjištěno FTIR spektrem ATR techniky, došlo k určitému rozpuštění chitosanu, změna kontaktního úhlu to jen potvrdila. I když došlo ke změně, materiál je pořád hodnocen jako hydrofilní. Kontaktní úhel se promýváním v 96% ethanolu zvětšil. Dalším rozdílem je, že u promytého materiálu nedochází ke změně úhlu časem. V grafu 7 je

Elektrostatické zvláknění směsi polykaprolaktonu a chitosanu a jeho biologické testování

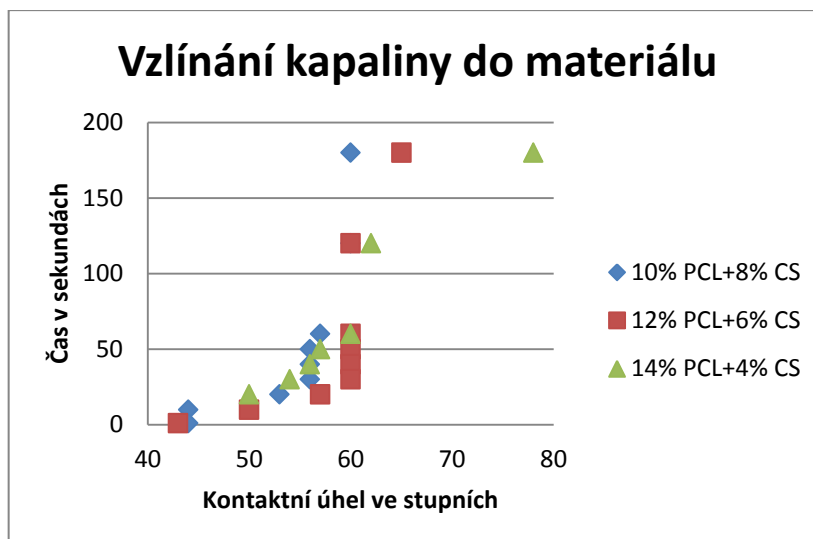
znázorněno vztlínání kapaliny do materiálu. Výsledky měření kontaktního úhlu byly převzaty z diplomové práce Pavly Sykáčkové s názvem Vliv hydrofilních/hydrofobních vlastností nanovlákných tkáňových nosičů na buněčnou adhezi [33].

| čas | 10%PCL+8%CS | 12%PCL+6%CS | 14%PCL+4%CS | měření | PCL |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|------------|---------|
| 1sek. | 60° | 65° | 78° | 1. | 114,9° |
| 10sek. | 60° | 60° | 62° | 2. | 116,4° |
| 20sek. | 57° | 60° | 60° | 3. | 119,6° |
| 30sek. | 56° | 60° | 57° | 4. | 108,7° |
| 40sek. | 56° | 60° | 56° | 5. | 118,5° |
| 50sek. | 56° | 60° | 54° | průměr | 115,62° |
| 1min. | 53° | 57° | 50° | směr.odch. | 3,8 |
| 2min. | 44° | 50° | 35° | | |
| 3min. | 44° | 43° | 22° | | |
| změna úhlu PCL/CS po promytí | | | | | |
| čas | 10%PCL+8%CS | 12%PCL+6%CS | 14%PCL+4%CS | | |
| bez změny | 63,23° | 80° | 78° | | |

Tabulka 9 Hodnoty úhlů měřených materiálů

V článku Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants od Lucie Bačákové, kde se porovnávají nanovlákné vrstvy vzhledem ke své hydrofobitě/hydrofilitě je uváděno, že nejvhodnějším materiálem pro proliferaci buněk je materiál s povrchem mírně hydrofilním [34]. Materiál s extrémně hydrofobním povrchem je sice vhodný, ale po čase může dojít k oddělení buněčné tkáně od scaffoldu. Na povrchu, který je zase naopak extrémně hydrofilní, se buňky špatně množí.

Z výsledků měření kontaktního úhlu testovaných materiálů (graf 7) je zřejmé, že ani jeden z materiálů není extrémně hydrofilní/hydrofobní. Z tohoto důvodu mohou být označeny jako za vhodné, na základě posouzení kontaktního úhlu.



Graf 7 Hodnoty kontaktních úhlů zvlákněných materiálů

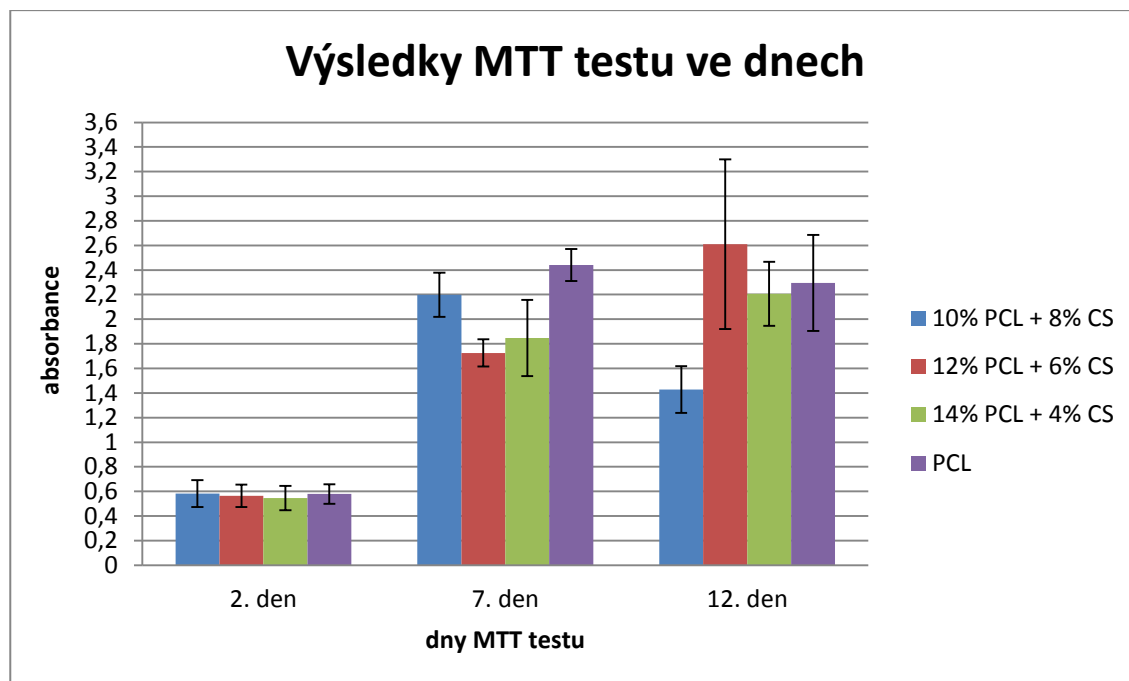
7.3 In vitro testy

7.3.1 MTT test

V tabulce 10 jsou znázorněny výsledky MTT testu. Na jejich základě lze tvrdit, že materiál ve směsi PCL/CS se jeví jako vhodný tkáňový nosič, protože výsledky viability jsou velice podobné výsledkům samotného PCL. Díky těmto výsledkům může být nanovlákněná vrstva směsi PCL/CS označena jako vhodnou pro použití ve tkáňovém inženýrství. Průměrné hodnoty absorbance s chybovými úsečkami jsou znázorněny v grafu 4.

Tabulka 10 Výsledné průměrné hodnoty MTT testu po měření

| Testovaný materiál | Průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou | | |
|------------------------|---|------------|------------|
| | 2. den | 7. den | 12. den |
| 10% PCL + 8% CS | 0,582±0,11 | 2,198±0,18 | 1,428±0,19 |
| 12% PCL + 6% CS | 0,564±0,09 | 1,726±0,11 | 2,611±0,69 |
| 14% PCL + 6% CS | 0,546±0,10 | 1,848±0,31 | 2,207±0,26 |
| PCL | 0,579±0,08 | 2,441±0,13 | 2,295±0,39 |



Graf 8 Výsledky MTT testu ve dnech

Naměřené hodnoty absorbance byly použity pro statistické vyhodnocení. Spolu s F-testem byl proveden dvou výběrový t-testu, pro který se stanovila nulová a alternativní hypotéza.

H_0 = střední hodnoty viability buněk se v jednotlivých materiálech neliší.

H_A = střední hodnoty viability buněk se v jednotlivých materiálech liší

Porovnání bylo na hladině $\alpha = 0,05$. Před použitím t-testu se nejdříve ověřil předpoklad, že rozptyly jsou shodné. Ověření se provedlo pomocí F-testu pro rozptyl. Vypočítaná p-hodnota se porovnávala vzhledem k hladině $\alpha = 0,05$. p-hodnota menší než α udává, že rozptyly nejsou shodné, p-hodnota větší než α udává, že rozptyly jsou shodné. Neshodné rozptyly jsou vyznačeny žlutě v tabulce 11.

Tabulka 11 F-test pro rozptyl

| Dvouvýběrový F-test pro rozptyl | | | | |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------|
| p-hodnota | 10% PCL + 8% CS | 12% PCL + 6% CS | 14% PCL + 4% CS | PCL |
| 10% PCL + 8% CS | | 0,0337 | 0,3155 | 0,1321 |
| 12% PCL + 6% CS | 0,0337 | | 0,0752 | 0,2017 |
| 14% PCL + 4% CS | 0,3155 | 0,0752 | | 0,2529 |
| PCL | 0,1321 | 0,2017 | 0,2529 | |

Na základě výsledků F-testu byl proveden test pro ověření nebo vyvrácení hypotézy. Opět se testovalo na hladině $\alpha=0,05$. Pro shodné rozptyly se použil dvouvýběrový t-test s rovností rozptylů, pro neshodné rozptyly se použil dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylů.

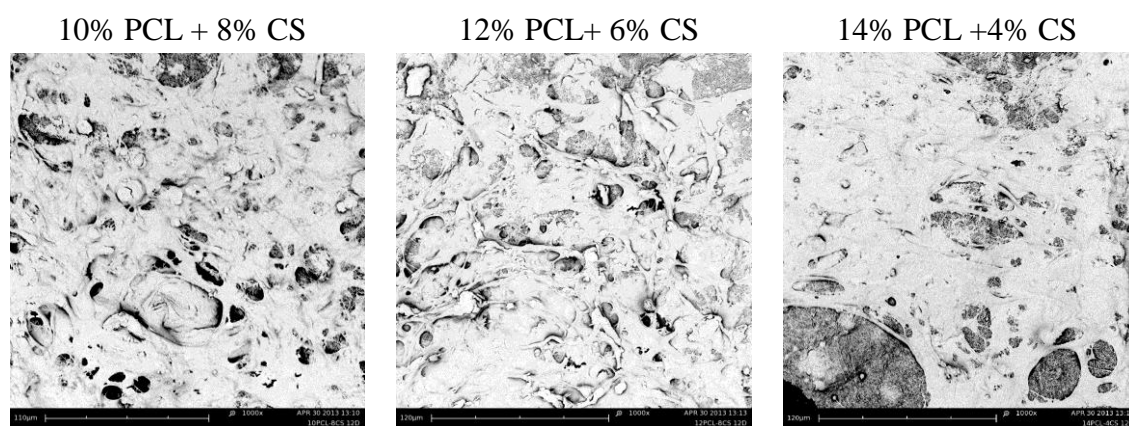
Tabulka 12 Dvouvýběrový t-test

| Dvouvýběrový t-test | | | | |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------|
| p-hodnota | 10% PCL + 8% CS | 12% PCL + 6% CS | 14% PCL + 4% CS | PCL |
| 10% PCL + 8% CS | | 0,0605 | 0,0056 | 0,0138 |
| 12% PCL + 6% CS | 0,0605 | | 0,3678 | 0,5074 |
| 14% PCL + 4% CS | 0,0056 | 0,3678 | | 0,7578 |
| PCL | 0,0138 | 0,5074 | 0,7578 | |

Z výsledků tabulky 12 lze usoudit, že nulová hypotéza se zamítá a přijímá se hypotéza alternativní pro vzorky 10% PCL + 8% CS a 14% PCL + 4% CS a samotné PCL na základě kritérií. Vyplyvá s toho tedy, že směrodatné odchylky viability buněk se u materiálů liší. U ostatních materiálů (12% PCL + 6% CS) se nulová hypotéza přijímá – směrodatné odchylky viability buněk se v jednotlivých materiálech neliší. S pravděpodobností na testované hladině významnosti $\alpha=0,05$ se materiál 12% PCL + 6% CS zdá být vhodný pro viabilitu buněk. Ostatní materiály takový výsledek neměly.

7.3.2 SEM

Snímky zde prezentované jsou pro posouzení proliferace buněk na nanovláknenných tkáňových nosičích. Jsou pořízeny pouze z určitých částí tkáňového nosiče, protože rastrovací mikroskop má minimální zvětšení 500x. Ve vzájemném porovnání jednotlivých dnů daných materiálů lze, potvrdit že množství buněk časem rostlo. Na obrázku 27 jsou snímky z 12. dne testování. I když se zdá, že 10% PCL + 8% CS oproti 14% PCL + 4% CS je více prorostlý buňkami, graf 8 tento dojem vyvrací. Snímky jsou jen pro vizuální posouzení, o množství buněk v materiálu nevypovídají. Přehled všech snímků pro 2., 7. a 12. den je v příloze F.

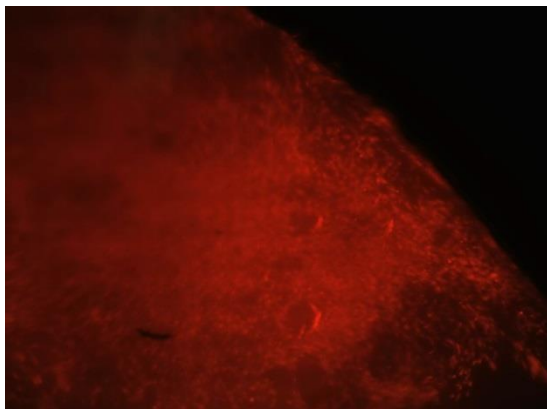


Obrázek 27 SEM snímky z 12. dne (zvětšení 1000x)

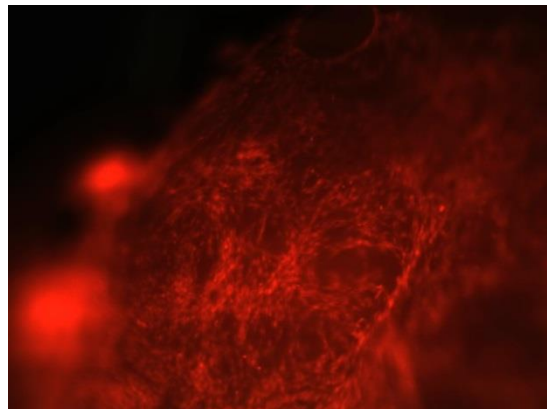
7.3.3 Fluorescence

Pomocí metody fluorescenční mikroskopie byl získán přehled o rozmístění buněčné populace na scaffoldu. Z důvodu 3D struktury scaffoldu není možné zaostřit na všechna obarvená buněčná jádra, proto nebylo provedeno počítání buněk na ploše scaffoldu. Snímky nám však dávají odhad počtu buněk a jejich prostorové rozmístění. Nasnímány byly jen určité části tkáňového nosiče, ne celek. Z důvodu pořízení snímků na invertovaném fluorescenčním mikroskopu a ne na konfokálním mikroskopu nemohlo být děláno další vyhodnocení snímků. Na obrázku 28 je ukázka snímků fluorescence buněk z testovaných nanovláknenných vrstev. Snímky jsou pořízeny z 12. dne testování, jak je vidět, tak materiály jsou prorostlé buňkami až do krajů tkáňového nosiče. Přehled všech snímků z fluorescence je v příloze G.

10% PCL + 8% CS (zvětšení 100x)



PCL (zvětšení 100x)



Obrázek 28 Ukázka snímků fluorescence z 12. dne

ZÁVĚR

Experimentem byly nalezeny vhodné koncentrace polymerní směsi polykaprolaktonu s chitosanem. Vyrobené nanovláknenné vrstvy byly homogenní, téměř bez defektů, které se hojně vyskytují při zvlákňování PCL. Po zjištění změny pH destilované vody po louhování zvlákněných vrstev se provedlo vymytí zbytkových kyselin.

Pro *in vivo* testování je odstranění zbytků kyselin klíčové, jelikož může docházet k nežádoucím reakcím organismu. Pro *in vitro* testování scaffold se zbytkovými kyselinami lze použít, ale pak by výsledky biologického testování byly nepodstatné, nebylo by možné použití *in vivo*. Odstraňování kyselin bylo prováděno pouze experimentálně na základě několika pokusů. Jelikož je chitosan rozpustný v roztocích s pH pod 6, při louhování ve vodě může dojít k jeho rozpuštění. Tento fakt se bohužel potvrdil, a proto se musel najít vhodný roztok, který vrstvu zbaví kyselin, nezmění výrazně její strukturu a nerozpustí chitosan. Pro odstranění kyselin byl nakonec zvolen 96% ethanol, který sloužil i jako sterilizační roztok před *in vitro* testováním. Přítomnost chitosanu se po 12-tém vymývání, kdy se pH roztoku utálilo, ověřila FTIR spektrometrií a změřením kontaktního úhlu. Výsledky měření jeho přítomnost potvrdily, proto byla metoda vymývání brána za vhodnou.

Materiál směsi PCL/CS zbavený kyselin se poté použil pro biologické testování v porovnání se samotným polykaprolaktonem. Dle testování viability buněk pomocí MTT testu vyšlo, že nanovláknenná vrstva 12% PCL + 6% CS má po 12-ti dnech nejlepší výsledky.

Kombinací přírodního a syntetického polymeru vznikl materiál s výhodnými vlastnostmi obou polymerů. Chitosan snížil množství defektů v nanovláknenné vrstvě a došlo i ke zmenšení průměrů nanovláken. Přítomnost chitosanu přispěla ke snížení hydrofobicity PCL. Zvolení chitosanu pro směšování s polykaprolaktonem bylo hlavně pro jeho antibakteriální účinky, které jsou od tohoto nově vytvořeného materiálu také očekávány. Přítomnost polykaprolaktonu dodá materiálu mechanickou pevnost, kterou postrádají přírodní materiály.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] LANGER, Rober a Joseph VACANTI. Tissue engineering. *Science*. 1993, č. 260, s. 920-926. ISSN 0036-8075
- [2] SIPE, Jean, Christine Kelley a Loré Anne MCNICOL. Reparative Medicine: Growing Tissues and Organs. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006, roč. 1, č. 961, s. 13-14.
- [3] Tissue engineering. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2013-05-21]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Tissue_engineering
- [4] Epitelová tkáň. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2013-05-21]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Epitelov%C3%A1_tk%C3%A1%C5%88
- [5] MASOPUST, Jaroslav a Richard PRŮŠA. *Patobiochemie Buňky*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2003. ISBN 80-239-1011-0.
- [6] REKTOROVÁ, Irena. Tkáňové inženýrství a klonování. *Neurologie pro praxi*. 2002, č. 1.
- [7] VEJRAŽKA, Martin. *Buněčné kultury*. 2012. Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>
- [8] ALBERTS, B. et al. *Základy buněčné biologie – úvod do molekulární biologie buňky*. Z angl. 1. vyd. přel. Arnošt Kotyk, Pavel Honzák. 2. vyd. v ČR. Ústí nad Labem: Espero Publishing s.r.o., 2005. ISBN 80-902906-2-0.
- [9] KUCHYŇKA, Pavel. A KOLEKTIV. *Oční lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a. s., 2007. ISBN 978-80-247-1163-8.
- [10] TŘESOHLAVÁ, Eliška a František RYPÁČEK. *Buněčná terapie* [online]. 2009 [cit. 2012-09-21]. Dostupné z: <http://bunecnaterapie.cz/zajimavosti/2009/polymerni-biomaterialy-pro-obnovu-tkani>
- [11] CHEUNG, Hoi-Yan, Kin-Tak LAU, Tung-Po LU a David HUI. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Composites: Part B*. 2007, č. 38, 291–300.
- [12] SAXENA, Amulya a ANTONIOS MIKOS. Tissue engineering: Present concepts and strategies. *Review Article*. 2005, roč 10, č. 1, s. 14-19.

- [13] LUKÁŠ, David. a kolektiv. *Lékařské textilie: 2. díl*. první. Praha: Design a výroba Radix, spol. s r. o., 2008. ISBN 978-80-7372-475-7.
- [14] AGARWAL, Seema, Joachim H. WENDORFF a Andreas Greine GREINE. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*. 2008, č. 49, s. 5603-5621.
- [15] PHAM, Quynh, Upma SHARMA a Antonios MIKOS. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Engineering*. 2006, roč. 12, č. 5, s. 1197-1211.
- [16] AGARWAL, Seema, Joachim WENDORFF a Andreas GREINER. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*. 2008, č. 49, s. 5603–5621.
- [17] Nanovlákn. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2013-05-23]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Nanovl%C3%A1kno>
- [18] TAYLOR, Geoffrey. Electrically driven jets. *Proceeding of the Royal Society London, Series A, Mathematical and Physical Sciences*,. 1969, č. 105, s. 453-475.
- [19] HUTMACHERA, Dietmar, Andres GARCIA, Tomas RUMML. Scaffold-based bone engineering by using genetically modified cells. *Gene*. 2005, č. 347, s. 1–10.
- [20] GUNATILLAKE, Pathiraja A. a Raju ADHIKARI. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials*. 2003, č. 5, s. 1-16. DOI: 1473-2262.
- [21] PETRÁŠ, David, Dušan KIMMER, Karel SOUKUP a Petr KLUSOŇ. Bezpečná Nanovlákn. *Chemické listy*. 2009, č. 103, s. 1009-1016.
- [22] CROISIER, Florence Croisier a Christine JÉRÔME. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*. 2013, roč. 49, č. 4, s. 780-792.
- [23] MADIHALLY, Sundararajan V. Processing chitosan for tissue regeneration. *Current Trends in Polymer Science*. 2011, Vol. 15, s. 83-88.
- [24] ELSABEHA, Maher Z., Hala F. NAGUIBA a Rania Elsayed MORSI. Chitosan based nanofibers, review. *Materials Science and Engineering: C*. 2012, roč. 32, č. 7, s. 1711-1726.
- [25] HERMANOVÁ, Soňa. *Chempoint* [online]. 2012 [cit. 2012-09-21]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/polykaprolakton-biodegradabilni-polyester>

- [26] HELÁNOVÁ, Valerie. *Chempoint* [online]. 2012 [cit. 2012-09-21]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/plynova-chromatografie-pomocnik-pri-studiu-degradace-polykaprolaktonu>
- [27] WOODRUFF, Maria Ann a Dietmar Werner HUTMACHER. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*. 2010, roč. 35, č. 10, s. 1217-1256
- [28] PILLAI, C.K.S., Willi Paul PAUL a Chandra SHARMA. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*. 2009, č. 34, s. 641-678.
- [29] COOPER, Ashleigh, Narayan BHATTARAI a Miqin ZHANG. Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan–PCL fibers for nerve tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers*. 2011, č. 85, s. 149-156.
- [30] VAN DER SCHUEREN, Lien, Iline STEYAERT, Bert DE SCHOENMAKER a Karen DE CLERCK. Polycaprolactone/chitosan blend nanofibres electrospun from an acetic acid/formic acid solvent system. *Carbohydrate Polymers*. 2012, č. 88, s. 1221-1226.
- [31] VAN DER SCHUEREN, Lien, Bert DE SCHOENMAKER, Özlem I. KALAOGLU a Karen DE CLERCK. An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone. *European Polymer Journal*. 2011, č. 47, s. 1256-1263.
- [32] GENG, Xinying, Oh-Hyeong KWON a Jinho JANG. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials*. 2005, č. 26, s. 5427-5432.
- [33] SYKÁČKOVÁ, Pavla. *Vliv hydrofilních/hydrofobních vlastností nanovlákněných tkáňových nosičů na buněčnou adhezi*. Liberec, 2013. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci.
- [34] BACAKOVA, Lucie, Elena FILOVA, Martin PARIZEK, Tomas RUML a Vaclav SVORCIK. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*. 2011, č. 29, s. 739–767.

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obrázek 1 Použití tkáňové náhrady [1]..... | 13 |
| Obrázek 2 Proces tkáňového inženýrství [2] | 14 |
| Obrázek 3 Extrémně elastická kůže, následek špatného uspořádání fibril kolagenu [3] | 19 |
| Obrázek 4 Struktura podpůrné konstrukce [4] | 20 |
| Obrázek 5 Znázornění prorůstání buněk vybranými materiály [5] | 23 |
| Obrázek 6 Zvlákňování z trysky [6] | 24 |
| Obrázek 7 Vzorec chitosanu a celulózy | 27 |
| Obrázek 8 Vzorec polykaprolaktonu | 29 |
| Obrázek 9 Ukázka SEM snímků zvlákněného PCL v koncentraci 10%-14%, zvláknovací systém kyselina octová : kyselina mravenčí (3:7) | 33 |
| Obrázek 10 Ukázka SEM snímků zvlákněného PCL v koncentraci 10%-14%, zvláknovací systém kyselina octová : kyselina mravenčí (7:3) | 34 |
| Obrázek 11 Porovnání různě starých zvlákněných roztoků - 16% PCL..... | 35 |
| Obrázek 12 SEM snímky zvlákněného PCL/CS z roztoku kyseliny octové a kyseliny mravenčí v poměru 3:7 | 36 |
| Obrázek 13 SEM snímky zvlákněného PCL/CS z roztoku kyseliny octové a kyseliny mravenčí v poměru 3:7 | 37 |
| Obrázek 14 Systém dvou a čtyř jehel..... | 37 |
| Obrázek 15 Mapa nepromytého PCL/CS a zobrazení 3D plochy pásů PCL a CS | 39 |
| Obrázek 16 Základná spektrum polykaprolaktonu a chitosanu | 40 |
| Obrázek 17 Znázornění spekter 12%PCL+6%CS a 14%PCL+4%CS | 41 |
| Obrázek 18 FTIR PCL/CS po 30 minutovém louhování..... | 44 |
| Obrázek 19 FTIR PCL/CS po 24 hodinách | 44 |
| Obrázek 20 FTIR PCL/CS po 30 minutách loužení v 70% ethanolu | 45 |
| Obrázek 21 FTIR PCL/CS po 24 hodinách | 45 |
| Obrázek 22 FTIR po 4 promytí a 24 hodinovém louhování | 47 |
| Obrázek 23 FTIR pro vymývání 100% ethanolem | 48 |
| Obrázek 24 Přehled ve změnách pH při vymývání se zhodnocením..... | 50 |
| Obrázek 25 Mapinng vzorku a 3D zobrazení pásů | 51 |
| Obrázek 26 Uspořádání vzorků v kultivační destičce..... | 54 |
| Obrázek 27 SEM snímky z 12. dne (zvětšení 1000x)..... | 64 |

ZDROJE OBRÁZKŮ

- [1] Scaffold-Guided. *Pittsburgh Tissue Engineering Initiative* [online]. 2013 [cit. 2012-10-23]. Dostupné z: <http://www.ptei.org/interior.php?pageID=84>
- [2] Tissue Engineering. *Division of Biology and Medicine* [online]. 2006 [cit. 2012-10-23]. Dostupné z: http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2007_Groups/group12/Homepage.html
- [3] ALBERTS, B. et al. *Základy buněčné biologie – úvod do molekulární biologie buňky*. Z angl. 1. vyd. přel. Arnošt Kotyk, Pavel Honzák. 2. vyd. v ČR. Ústí nad Labem: Espero Publishing s.r.o., 2005. ISBN 80-902906-2-0.
- [4] HUTMACHERA, Dietmar, Andres GARCIAC, Tomas RUMML. Scaffold-based bone engineering by using genetically modified cells. *Gene*. 2005, č. 347, s. 1–10.
- [5] AGARWAL, Seema, Joachim WENDORFF a Andreas GREINER. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*. 2008, č. 49, s. 5603–5621.
- [6] LUKÁŠ, David. a kolektiv. *Lékařské textilie: 2. díl*. první. Praha: Design a výroba Radix, spol. s r. o., 2008. ISBN 978-80-7372-475-7.

ZDROJE TABULEK

- [1] LUKÁŠ, David. a kolektiv. *Lékařské textilie: 2. díl*. první. Praha: Design a výroba Radix, spol. s r. o., 2008. ISBN 978-80-7372-475-7.

SEZNAM TABULEK

| | |
|--|----|
| Tabulka 1 Typy spojů a funkce spojení mezi buňkami | 18 |
| Tabulka 2 Funkce a vlastnosti scaffoldu [1] | 20 |
| Tabulka 3 pH roztoků pro promývání tkáňových nosičů směsi PCL/CS | 42 |
| Tabulka 4 Změna pH jednotlivých vzorků | 42 |
| Tabulka 5 Změna pH po 30 minutách..... | 46 |
| Tabulka 6 Ověření pH po 4 promytí | 47 |
| Tabulka 7 Výsledky pH z promývání vzorku amoniakem | 49 |
| Tabulka 8 Přehled ve změnách pH při vymývání se zhodnocením | 50 |
| Tabulka 9 Hodnoty úhlů měřených materiálů..... | 60 |
| Tabulka 10 Výsledné průměrné hodnoty MTT testu po měření..... | 61 |
| Tabulka 11 F-test pro rozptyl..... | 63 |
| Tabulka 12 Dvouvýběrový t-test..... | 63 |

SEZNAM GRAFŮ

| | |
|---|----|
| Graf 1 Změna viskozity zvlákňovacího roztoku PCL během dnů (rozpouštěcí systémem 7:3 - kyselina octová : kyselina mravenčí) | 35 |
| Graf 2 Změna pH po 24 hodinách..... | 43 |
| Graf 3 změna pH při promývání 96% ethanolem | 46 |
| Graf 4 Průměry vláken – rozpouštěcí systém 3:7 a 7:3 (kyselina octová : kyselina mravenčí) | 57 |
| Graf 5 Porovnání průměrů vláken vzhledem k systému zvlákňování | 58 |
| Graf 6 Průměry vláken materiálů použitých pro biologické testování | 59 |
| Graf 7 Hodnoty kontaktních úhlů zvlákněných materiálů | 61 |
| Graf 8 Výsledky MTT testu ve dnech..... | 62 |

SEZNAM PŘÍLOH

| | |
|--|-----|
| PŘÍLOHA A: VLÁKNA POLYKAPROLAKTONU | 75 |
| PŘÍLOHA B: VLÁKNA S PARAMETRY ZVLÁKŇOVÁNÍ A PRŮMĚRY VLÁKEN A DEFEKTŮ | 79 |
| PŘÍLOHA C: MATERIÁLY POUŽITÉ V EXPERIMENTU | 97 |
| PŘÍLOHA D: PRŮMĚRY VLÁKEN..... | 101 |
| PŘÍLOHA E: VÝSLEDKY PH PŘI PROMÝVÁNÍ VÝSLEDNÝCH MATERIÁLŮ 96% ETHANOLEM..... | 103 |
| PŘÍLOHA F: SEM SNÍMKY TKÁŇOVÉHO NOSIČE S BUŇKAMI PO DVOU, SEDMY A DVANÁCTI DNECH (ZVĚTŠENÍ 1000X)..... | 104 |
| PŘÍLOHA G: SNÍMKY Z FLUORESCENCE | 106 |

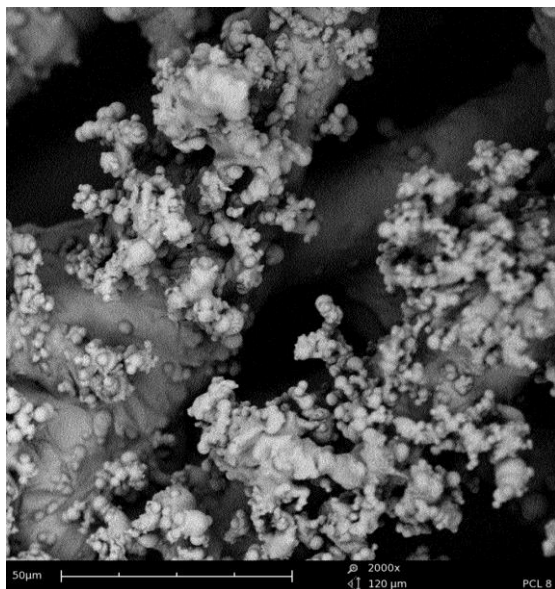
PŘÍLOHY

Příloha A: Vlákná polykaprolaktonu

Rozpouštědlo v poměru 3:7

Kyselina mravenčí - Formic acid – FA : Kyselina octová - acetic acid – AA

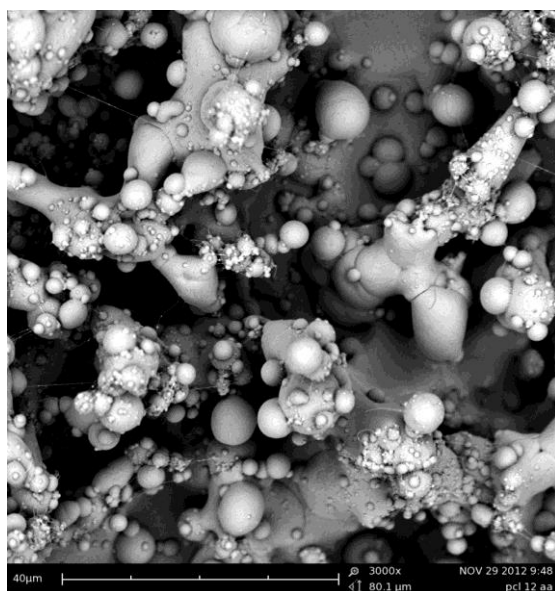
PCL 8% (zvětšení 2000 x)



PCL 10% (zvětšení 2000 x)



PCL 12% (zvětšení 3000x)



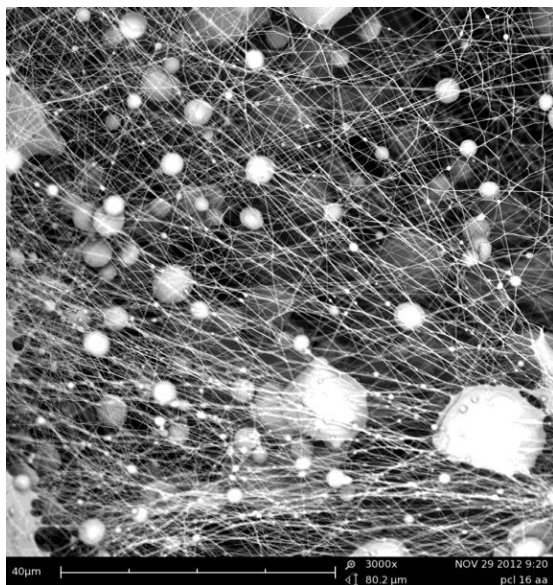
PCL 14% (zvětšení 3000x)



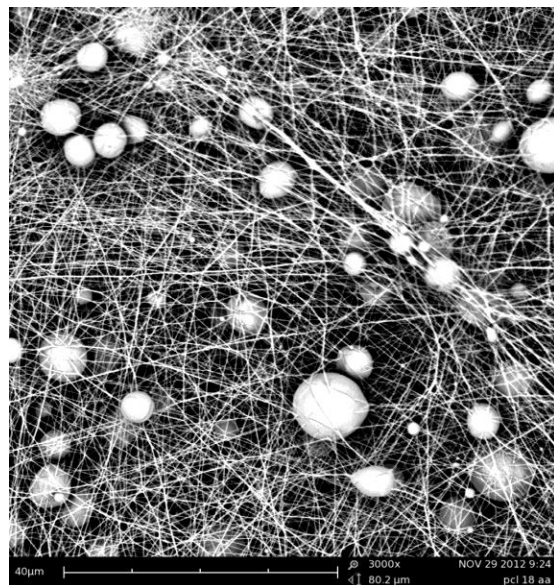
Rozpouštědlo v poměru 3:7

Kyselina mravenčí - Formic acid – FA : Kyselina octová - acetic acid – AA

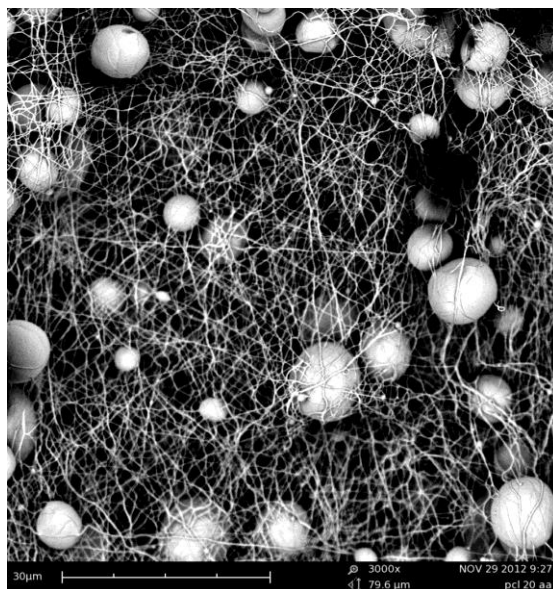
PCL 16% (zvětšení 3000x)



PCL 18% (zvětšení 3000x)



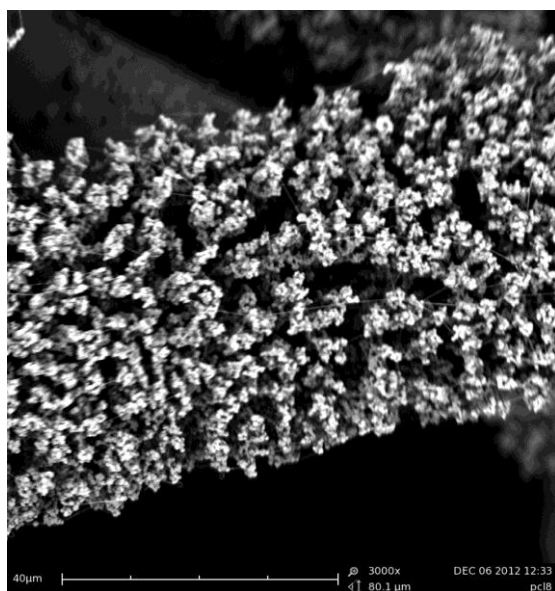
PCL 20% (zvětšení 3000x)



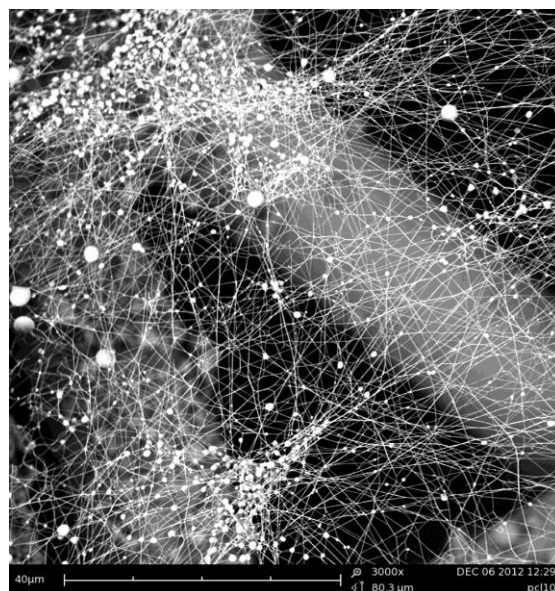
Rozpouštědlo v poměru 7:3

Kyselina mravenčí - formic acid – FA : Kyselina octová - acetic acid – AA

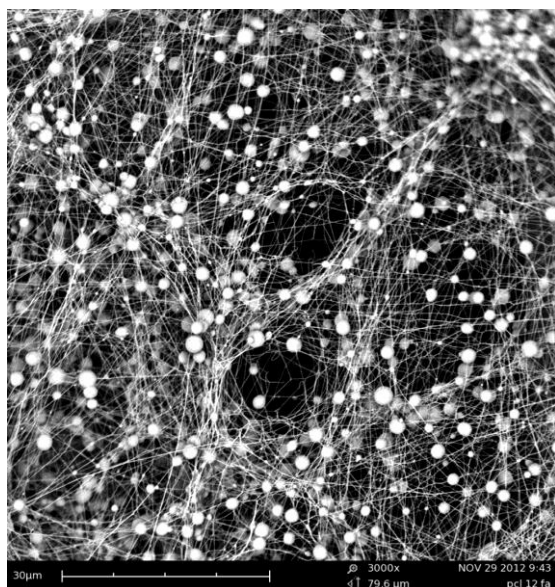
PCL 8% (zvětšení 3000x)



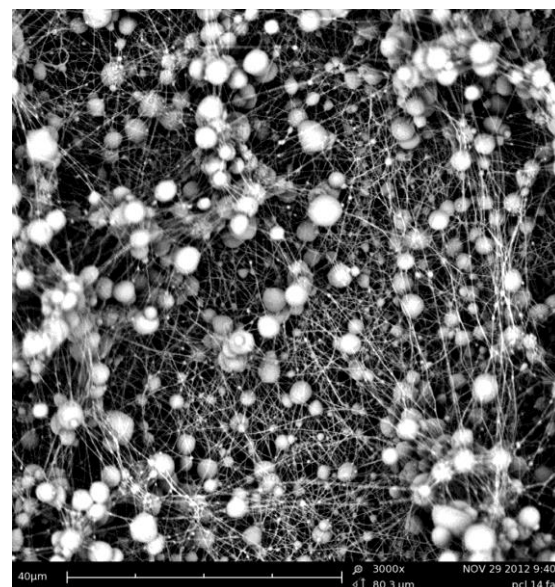
PCL 10% (zvětšení 3000x)



PCL 12% (zvětšení 3000x)



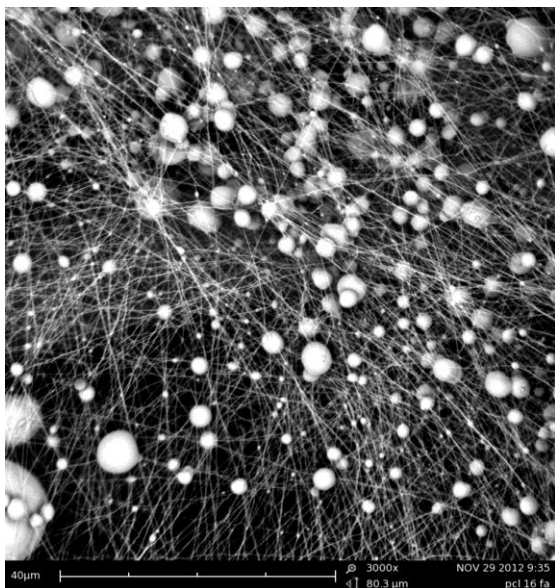
PCL 14% (zvětšení 3000x)



Rozpouštědlo v poměru 7:3

Kyselina mravenčí - formic acid – FA : Kyselina octová - acetic acid – AA

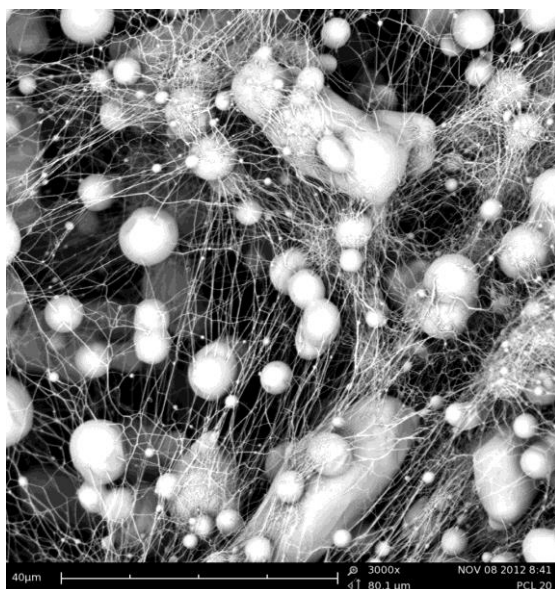
PCL 16% (zvětšení 3000x)



PCL 18% (zvětšení 3000x)

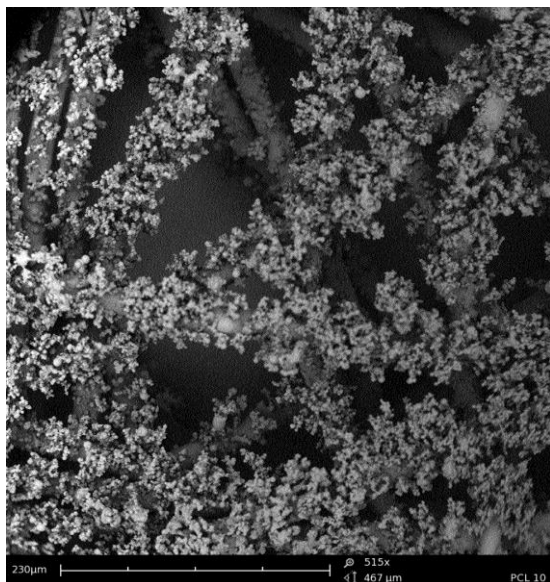


PCL 20% (zvětšení 3000x)

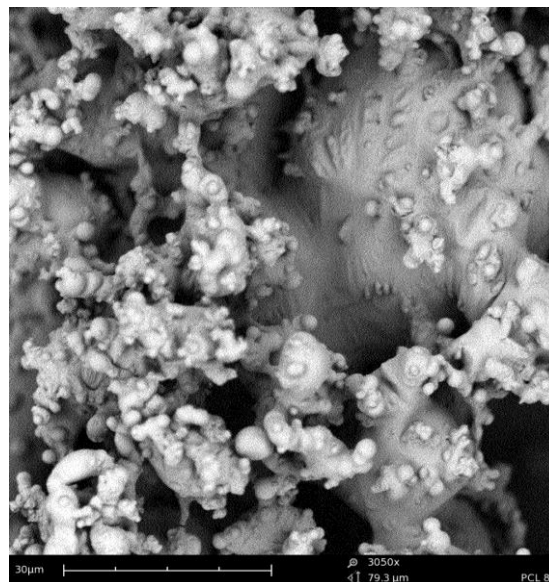


Příloha B: Vlákná s parametry zvlákňování a průměry vláken a defektů

8% PCL 3:7 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 515 x



zvětšení 3050 x

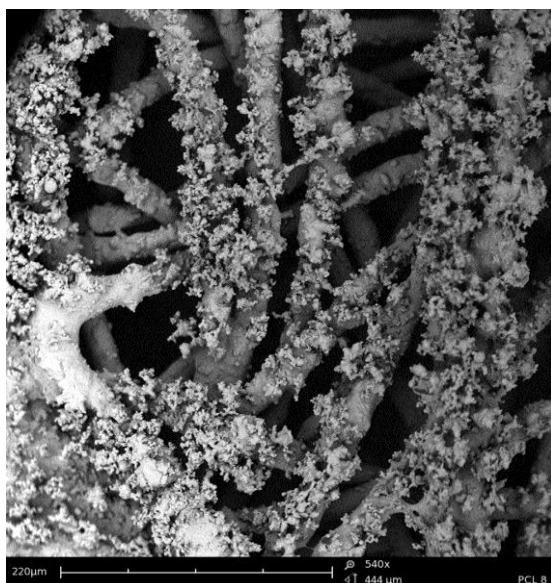
Parametry zvlákňování:

| | |
|----------------|----------|
| Napětí | 10,2 kV |
| Průtok | 0,5 ml/h |
| Vzdálenost | 10 cm |
| Vlhkost | 51 % |
| Okolní teplota | 21,1°C |

Parametry vláken:

| | |
|----------------------------------|--------------|
| Průměrná hodnota průměru vláken | nelze změřit |
| Směrodatná odchylka | nelze změřit |
| Minimální hodnota průměru vláken | nelze změřit |
| Maximální hodnota průměru vláken | nelze změřit |

10% PCL 3:7 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 540 x



zvětšení 2000 x

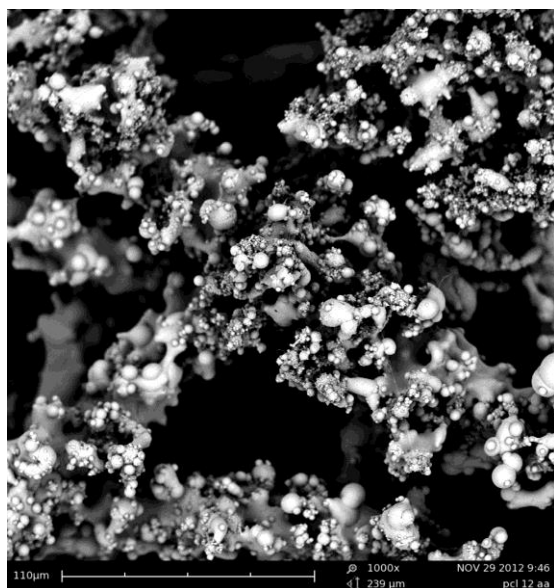
Parametry zvlákňování:

| | |
|----------------|-----------|
| Napětí | 10,8 kV |
| Průtok | 0,65 ml/h |
| Vzdálenost | 12 cm |
| Vlhkost | 52 % |
| Okolní teplota | 20,9°C |

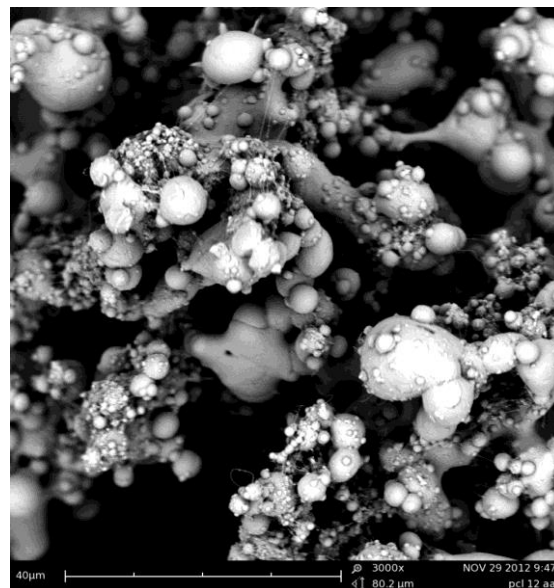
Parametry vláken:

| | |
|----------------------------------|--------------|
| Průměrná hodnota průměru vláken | nelze změřit |
| Směrodatná odchylka | nelze změřit |
| Minimální hodnota průměru vláken | nelze změřit |
| Maximální hodnota průměru vláken | nelze změřit |

12% PCL 3:7 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 1000 x



zvětšení 3000 x

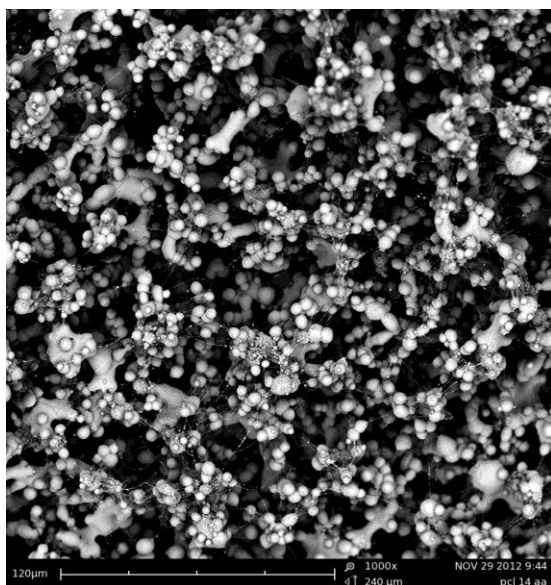
Parametry zvlákňování:

| | |
|----------------|-----------|
| Napětí | 16,7 kV |
| Průtok | 0,45 ml/h |
| Vzdálenost | 11 cm |
| Vlhkost | 48 % |
| Okolní teplota | 19,5°C |

Parametry vláken:

| | |
|----------------------------------|--------------|
| Průměrná hodnota průměru vláken | nelze změřit |
| Směrodatná odchylka | nelze změřit |
| Minimální hodnota průměru vláken | nelze změřit |
| Maximální hodnota průměru vláken | nelze změřit |

14% PCL 3:7 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 1000 x



zvětšení 3000 x

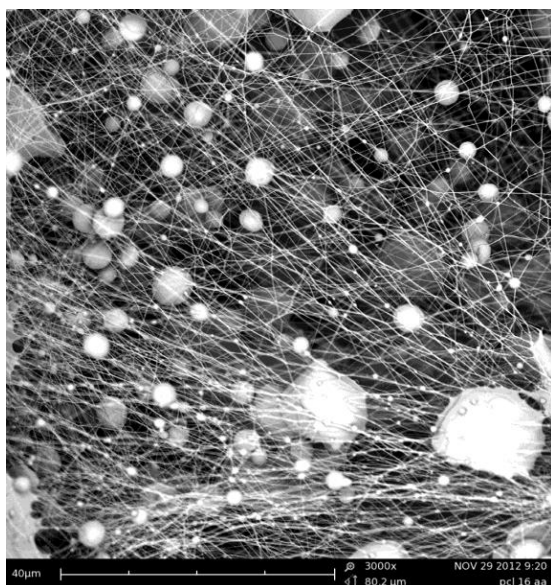
Parametry zvlákňování:

| | |
|----------------|----------|
| Napětí | 16,6 kV |
| Průtok | 0,3 ml/h |
| Vzdálenost | 11 cm |
| Vlhkost | 48 % |
| Okolní teplota | 20°C |

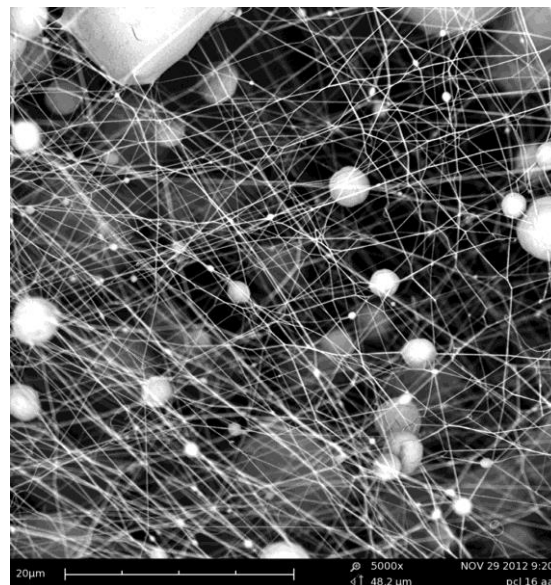
Parametry vláken:

| | |
|----------------------------------|--------------|
| Průměrná hodnota průměru vláken | nelze změřit |
| Směrodatná odchylka | nelze změřit |
| Minimální hodnota průměru vláken | nelze změřit |
| Maximální hodnota průměru vláken | nelze změřit |

16% PCL 3:7 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 3000 x



zvětšení 5000 x

Parametry zvlákňování:

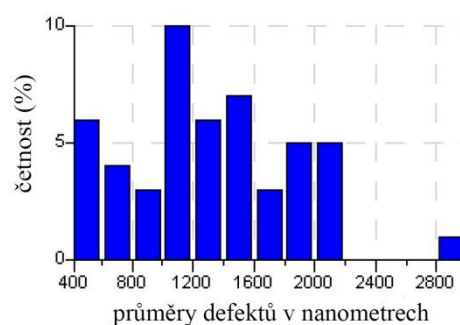
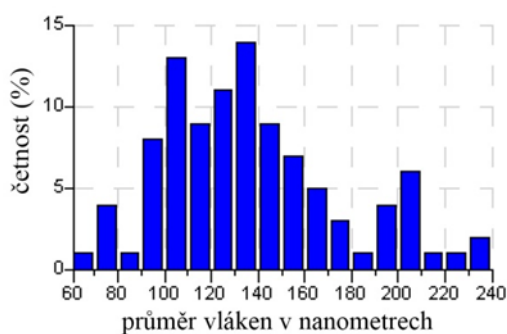
| | |
|----------------|-----------|
| Napětí | 12,5 kV |
| Průtok | 0,43 ml/h |
| Vzdálenost | 11 cm |
| Vlhkost | 46 % |
| Okolní teplota | 21,2°C |

Parametry vláken:

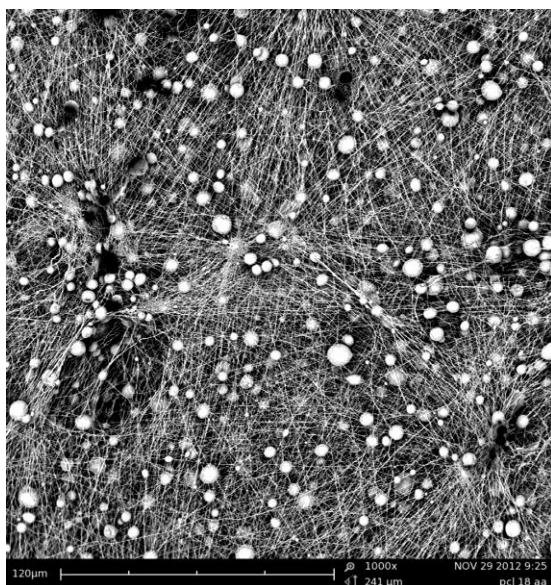
| | |
|----------------------------------|-----------|
| Průměrná hodnota průměru vláken | 136,74 nm |
| Směrodatná odchylka | 38,18 nm |
| Minimální hodnota průměru vláken | 65,35 nm |
| Maximální hodnota průměru vláken | 239,93 nm |

Parametry defektů:

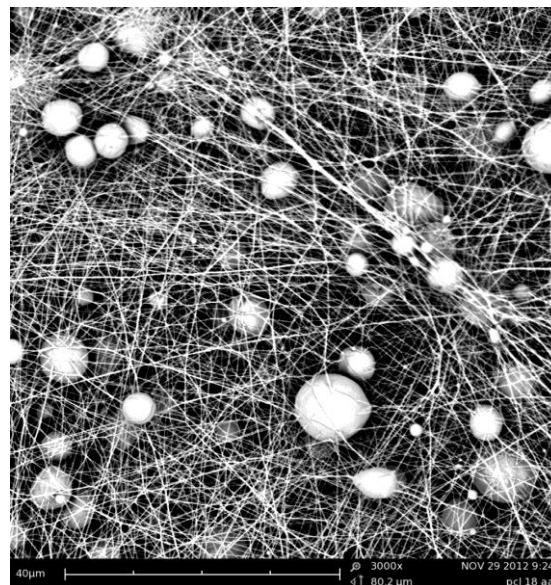
| | |
|----------------------------------|---------|
| Průměrná hodnota průměru defektů | 2652 nm |
|----------------------------------|---------|



18% PCL 3:7 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 1000 x



zvětšení 3000 x

Parametry zvlákňování:

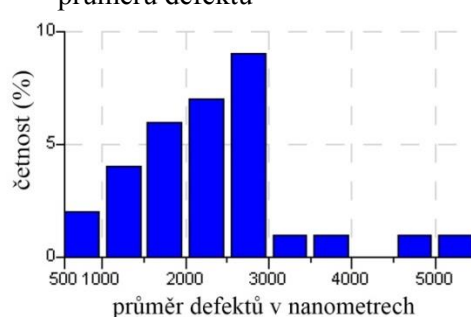
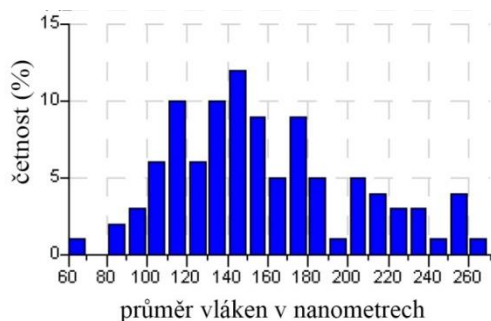
| | |
|----------------|-----------|
| Napětí | 14,7 kV |
| Průtok | 0,04 ml/h |
| Vzdálenost | 11 cm |
| Vlhkost | 48 % |
| Okolní teplota | 20,4°C |

Parametry vláken:

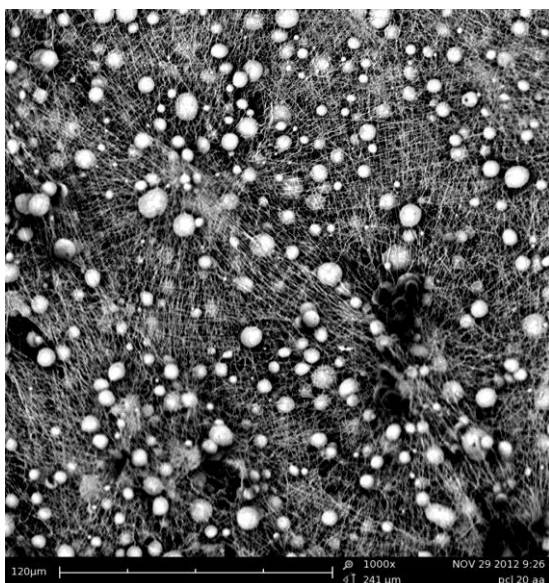
| | |
|----------------------------------|-----------|
| Průměrná hodnota průměru vláken | 158,15 nm |
| Směrodatná odchylka | 45,13 nm |
| Minimální hodnota průměru vláken | 68,88 nm |
| Maximální hodnota průměru vláken | 269,2 nm |

Parametry defektů:

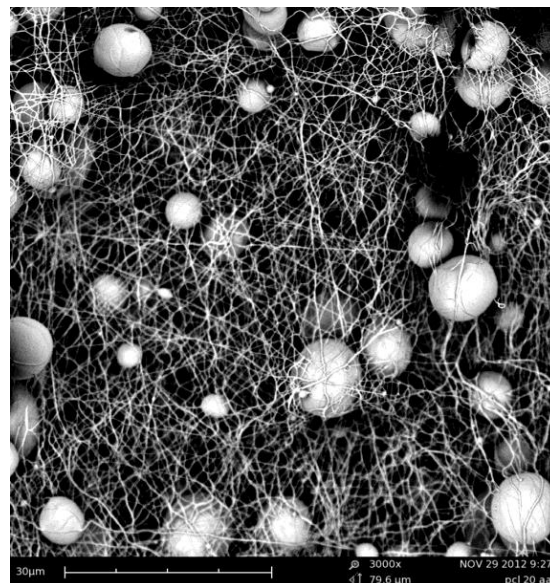
| | |
|----------------------------------|-----------|
| Průměrná hodnota průměru defektů | 4573,5 nm |
|----------------------------------|-----------|



20% PCL 3:7 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 1000 x



zvětšení 3000 x

Parametry zvlákňování:

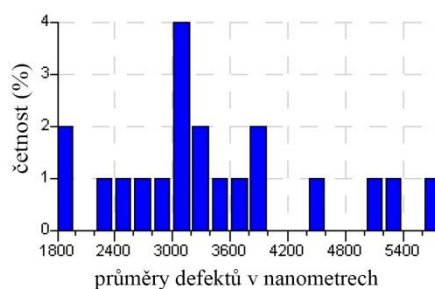
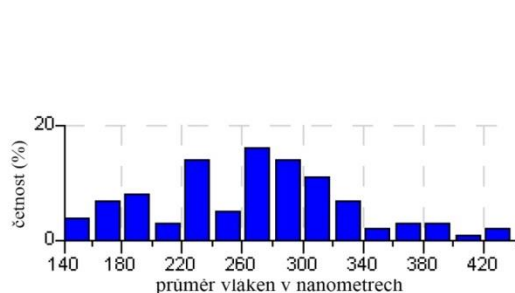
| | |
|----------------|----------|
| Napětí | 13,6 kV |
| Průtok | 1,5 ml/h |
| Vzdálenost | 11 cm |
| Vlhkost | 45 % |
| Okolní teplota | 21,6°C |

Parametry vláken:

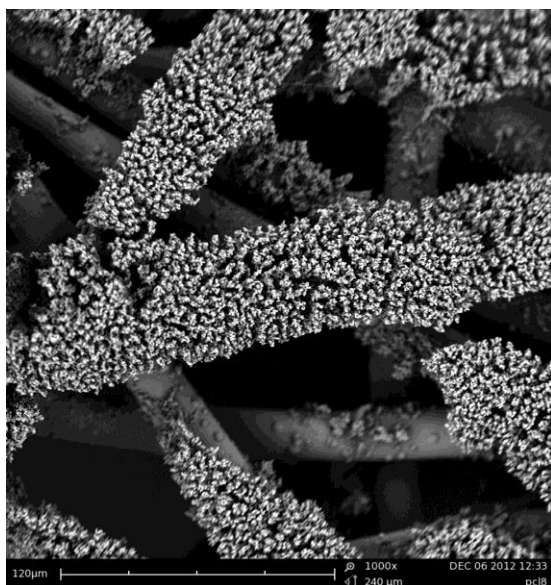
| | |
|----------------------------------|-----------|
| Průměrná hodnota průměru vláken | 267,29 nm |
| Směrodatná odchylka | 64,69 nm |
| Minimální hodnota průměru vláken | 147,87 nm |
| Maximální hodnota průměru vláken | 423,31 nm |

Parametry vláken:

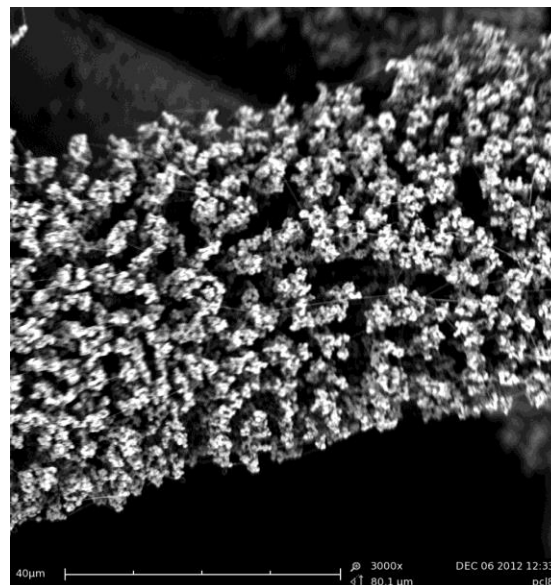
| | |
|----------------------------------|------------|
| Průměrná hodnota průměru defektů | 6871,65 nm |
|----------------------------------|------------|



8% PCL 7:3 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 1000 x



zvětšení 3000 x

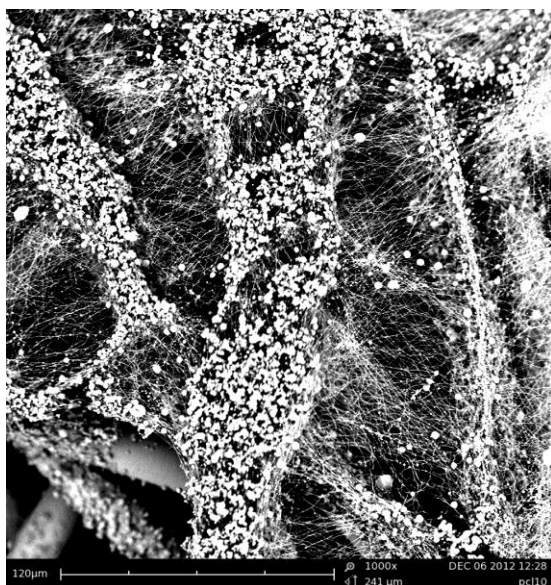
Parametry zvlákňování:

| | |
|----------------|---------|
| Napětí | 20,8 kV |
| Průtok | 2 ml/h |
| Vzdálenost | 9 cm |
| Vlhkost | 25 % |
| Okolní teplota | 18,6°C |

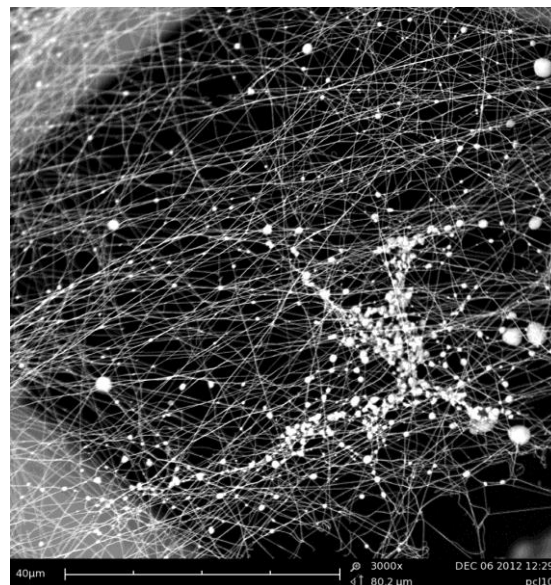
Parametry vláken:

| | |
|----------------------------------|--------------|
| Průměrná hodnota průměru vláken | nelze změřit |
| Směrodatná odchylka | nelze změřit |
| Minimální hodnota průměru vláken | nelze změřit |
| Maximální hodnota průměru vláken | nelze změřit |

10% PCL 7:3 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 1000 x



zvětšení 3000 x

Parametry zvlákňování:

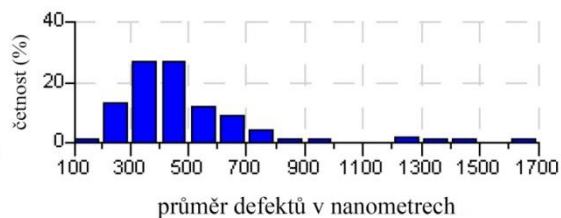
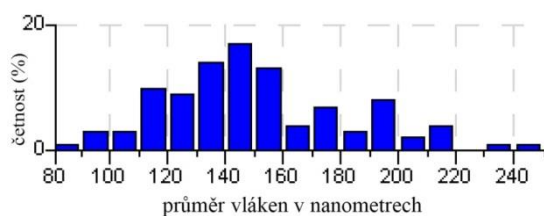
| | |
|----------------|-----------|
| Napětí | 14 kV |
| Průtok | 0,68 ml/h |
| Vzdálenost | 9 cm |
| Vlhkost | 25 % |
| Okolní teplota | 18,7°C |

Parametry vláken:

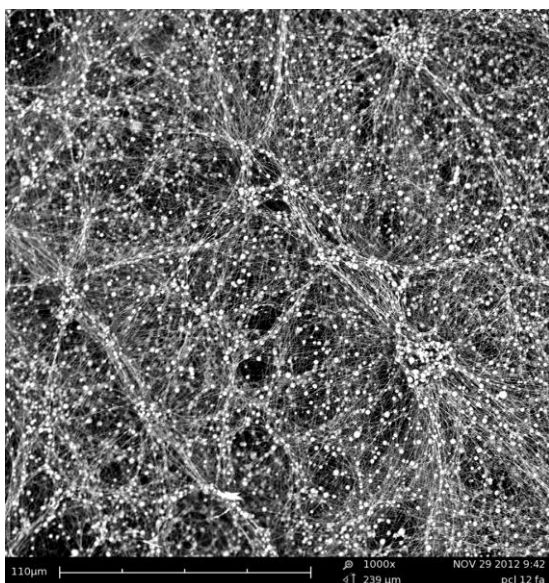
| | |
|----------------------------------|-----------|
| Průměrná hodnota průměru vláken | 151,02 nm |
| Směrodatná odchylka | 32,53 nm |
| Minimální hodnota průměru vláken | 85,21 nm |
| Maximální hodnota průměru vláken | 246 nm |

Průměr defektů:

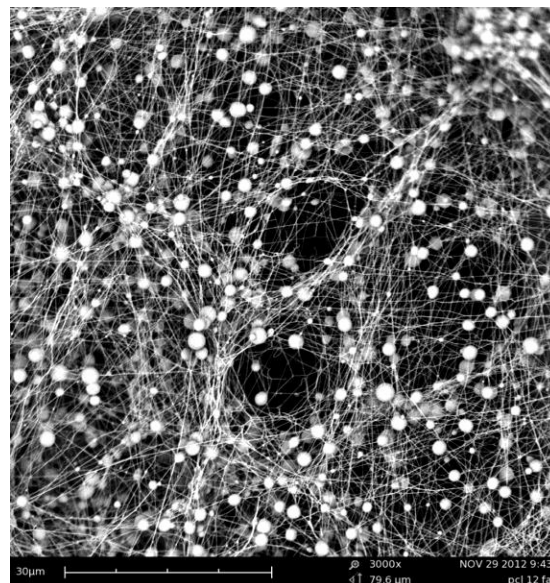
| | |
|----------------------------------|-----------|
| Průměrná hodnota průměru defektu | 981,24 nm |
|----------------------------------|-----------|



12% PCL 7:3 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 1000 x



zvětšení 3000 x

Parametry zvlákňování:

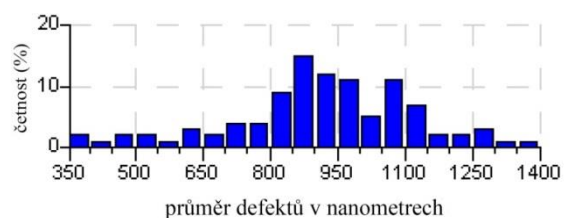
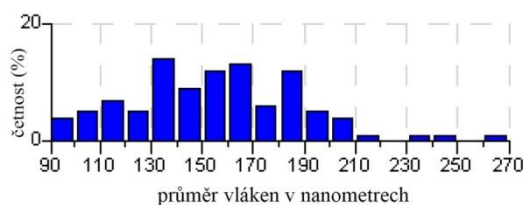
| | |
|----------------|----------|
| Napětí | 20 kV |
| Průtok | 0,1 ml/h |
| Vzdálenost | 11 cm |
| Vlhkost | 25 % |
| Okolní teplota | 20,2°C |

Parametry vláken:

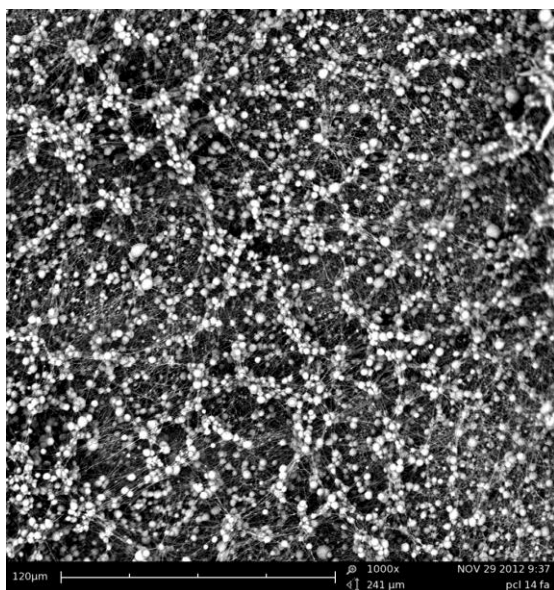
| | |
|----------------------------------|-----------|
| Průměrná hodnota průměru vláken | 155,46 nm |
| Směrodatná odchylka | 33,52 nm |
| Minimální hodnota průměru vláken | 92,48 nm |
| Maximální hodnota průměru vláken | 268,65 nm |

Průměr defektů:

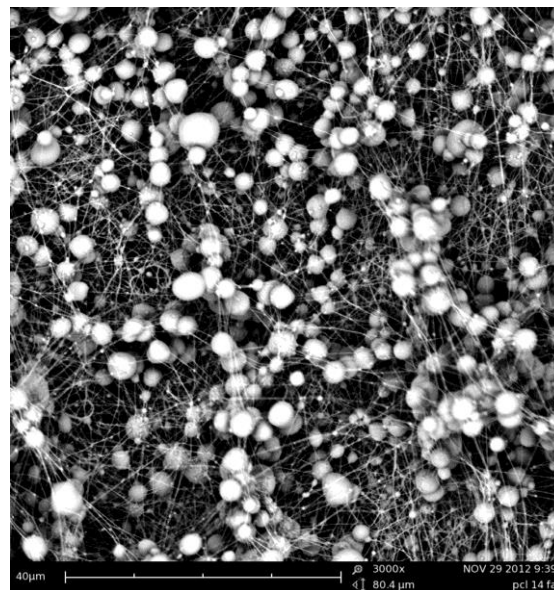
| | |
|----------------------------------|---------|
| Průměrná hodnota průměru defektu | 1830 nm |
|----------------------------------|---------|



14% PCL 7:3 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 1000 x



zvětšení 3000 x

Parametry zvlákňování:

Napětí 15,7 kV

Průtok 0,2 ml/h

Vzdálenost 12 cm

Vlhkost 42 %

Okolní teplota 20,8°C

Parametry vláken:

Průměrná hodnota průměru vláken 160,98 nm

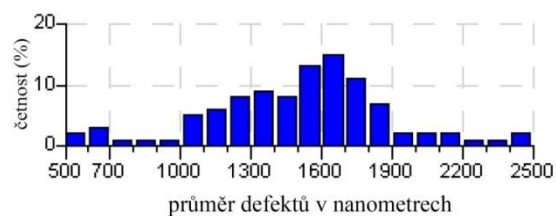
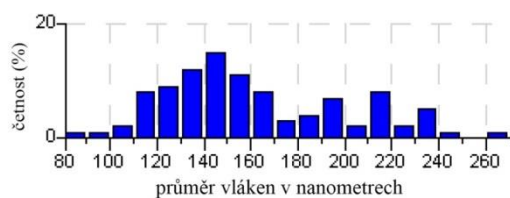
Směrodatná odchylka 38,1 nm

Minimální hodnota průměru vláken 83,69 nm

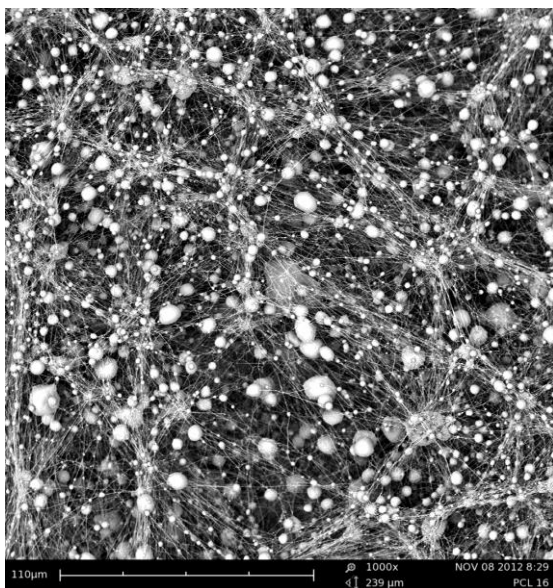
Maximální hodnota průměru vláken 266,28 nm

Průměr defektů:

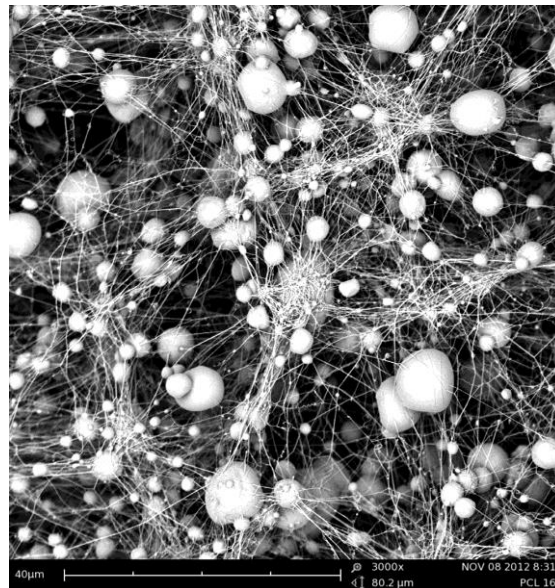
Průměrná hodnota průměru defektu 2994,89 nm



16% PCL 7:3 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 1000 x



zvětšení 3000 x

Parametry zvlákňování:

Napětí 15,3 kV

Průtok 0,1 ml/h

Vzdálenost 12 cm

Vlhkost 43 %

Okolní teplota 20,9°C

Parametry vláken:

Průměrná hodnota průměru vláken 142,01 nm

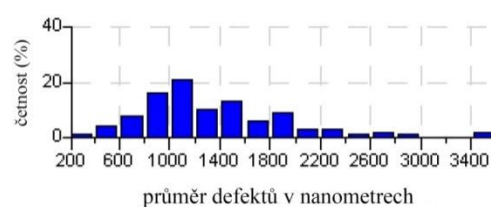
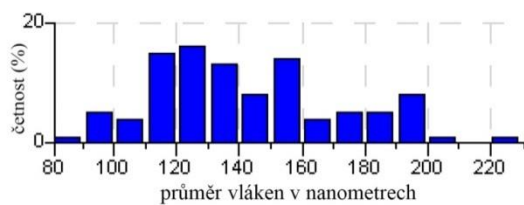
Směrodatná odchylka 29,62 nm

Minimální hodnota průměru vláken 81,88 nm

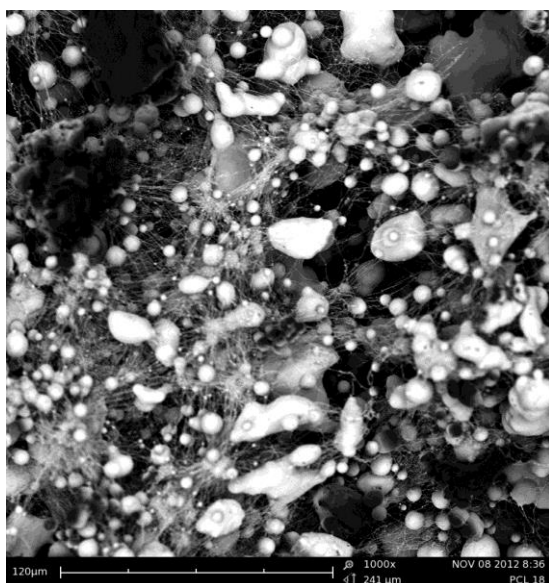
Maximální hodnota průměru vláken 223,17 nm

Průměr defektů:

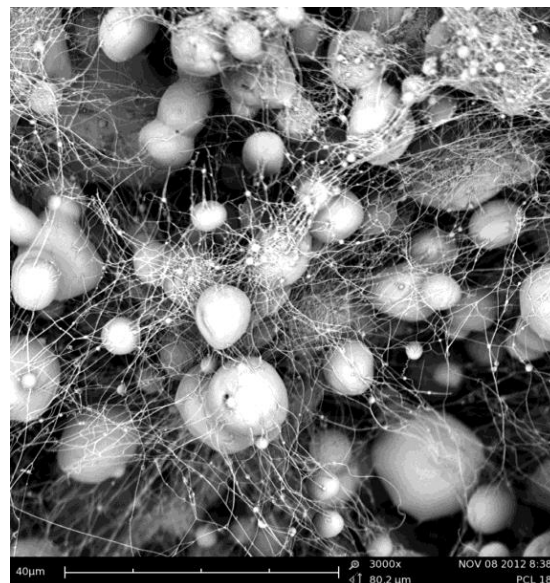
Průměrná hodnota průměru defektu 2714,9 nm



18% PCL 7:3 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 1000 x



zvětšení 3000 x

Parametry zvlákňování:

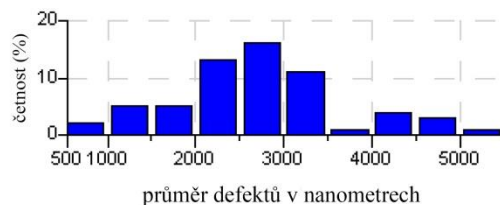
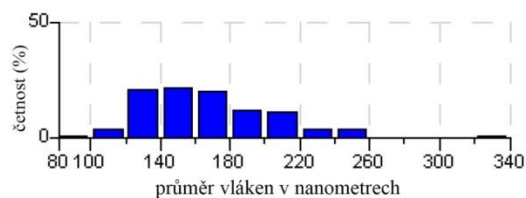
| | |
|----------------|-----------|
| Napětí | 14,7 kV |
| Průtok | 0,04 ml/h |
| Vzdálenost | 11,5 cm |
| Vlhkost | 48 % |
| Okolní teplota | 20,4°C |

Parametry vláken:

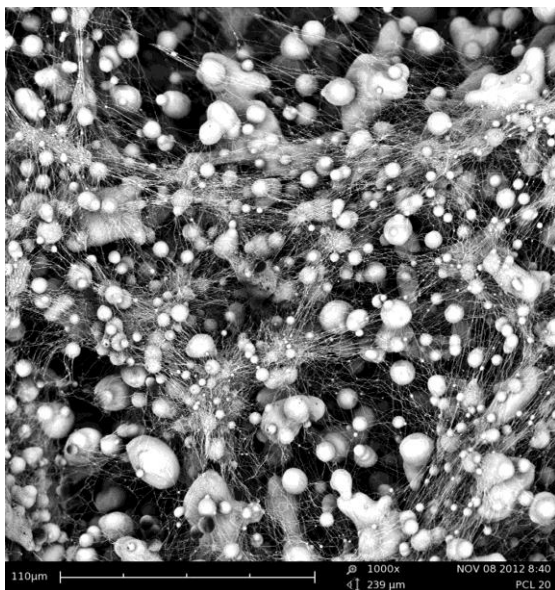
| | |
|----------------------------------|-----------|
| Průměrná hodnota průměru vláken | 168,51 nm |
| Směrodatná odchylka | 37,96 nm |
| Minimální hodnota průměru vláken | 99,91 nm |
| Maximální hodnota průměru vláken | 320,52 nm |

Parametr defektů:

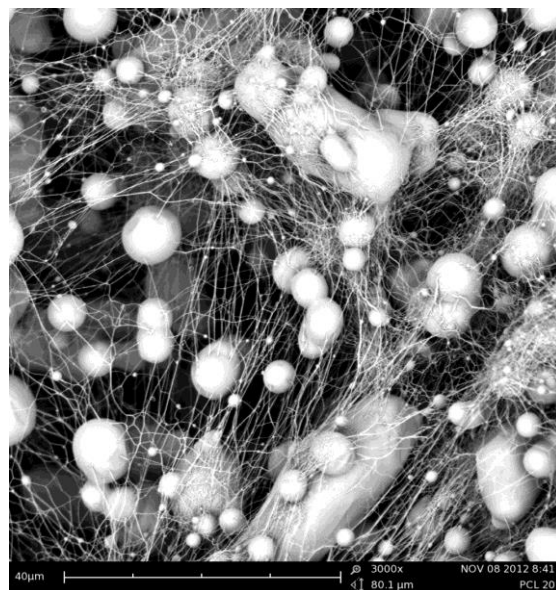
| | |
|----------------------------------|-----------|
| Průměrná hodnota průměru defektů | 1974,5 nm |
|----------------------------------|-----------|



20% PCL 7:3 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 1000 x



zvětšení 3000 x

Parametry zvlákňování:

Napětí 16,4 kV

Průtok 0,04 ml/h

Vzdálenost 12,5 cm

Vlhkost 45 %

Okolní teplota 20,8°C

Parametry vláken:

Průměrná hodnota průměru vláken 164,21 nm

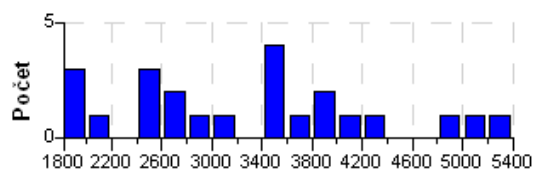
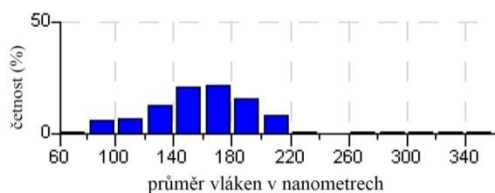
Směrodatná odchylka 46,48 nm

Minimální hodnota průměru vláken 70,69 nm

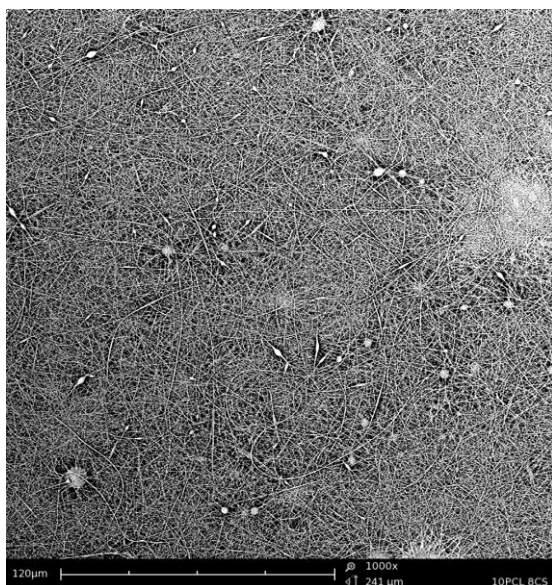
Maximální hodnota průměru vláken 346,85 nm

Parametr defektů:

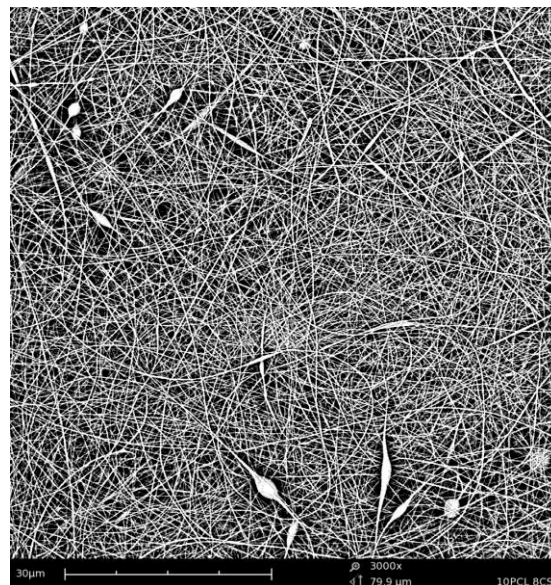
Průměrná hodnota průměru defektů 5100,17 nm



10% PCL a 8% CS 7:3 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 1000 x



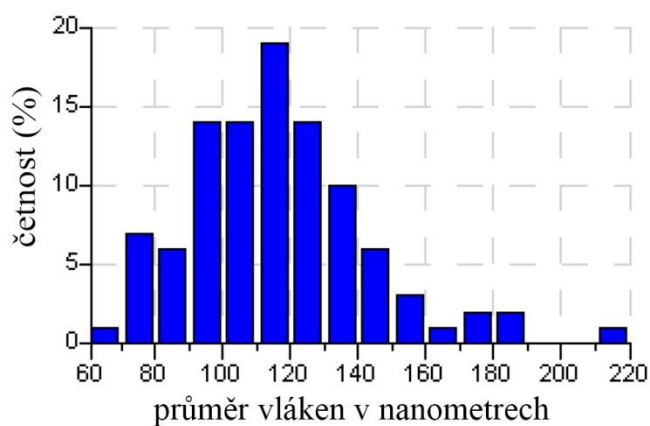
zvětšení 3000 x

Parametry zvlákňování:

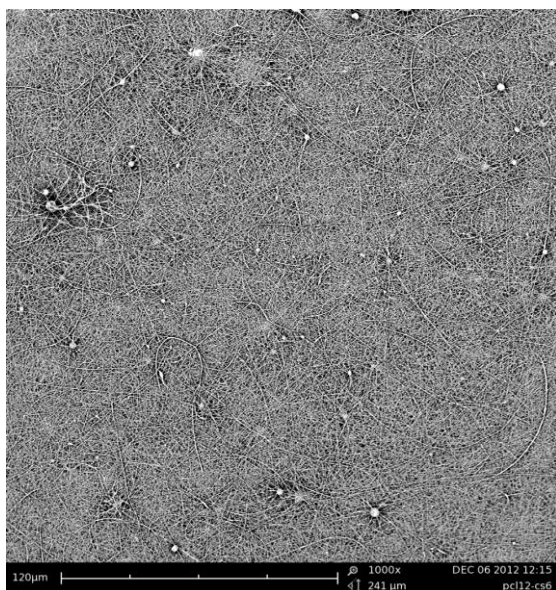
| | |
|----------------|-----------|
| Napětí | 48,2 kV |
| Průtok | 0,02 ml/h |
| Vzdálenost | 13 cm |
| Vlhkost | 43 % |
| Okolní teplota | 20,9°C |

Parametry vláken:

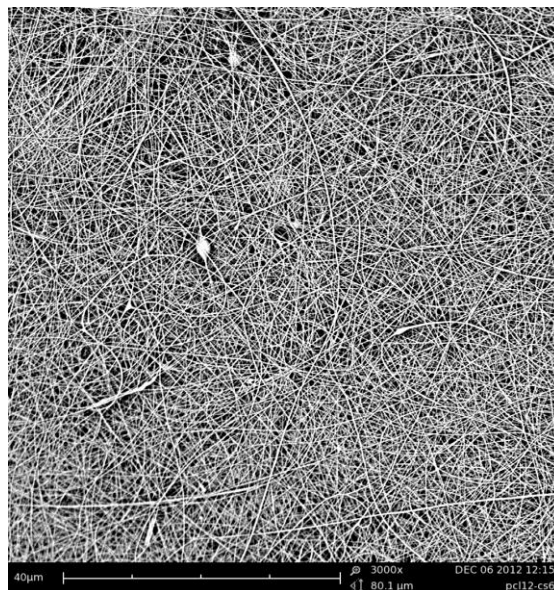
| | |
|----------------------------------|-----------|
| Průměrná hodnota průměru vláken | 170,95 nm |
| Směrodatná odchylka | 41,17 nm |
| Minimální hodnota průměru vláken | 98,89 nm |
| Maximální hodnota průměru vláken | 293,71 nm |



12% PCL a 6% CS 7:3 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 1000 x



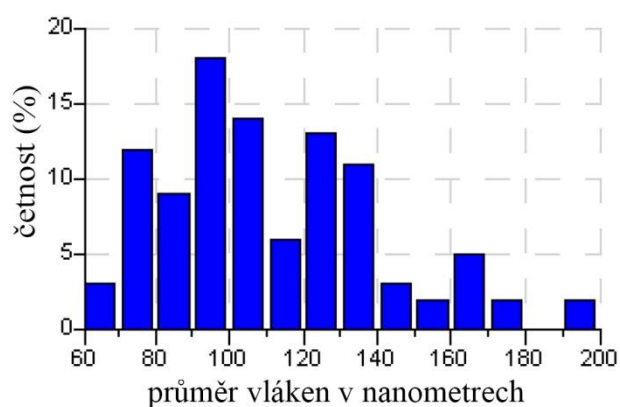
zvětšení 3000 x

Parametry zvlákňování:

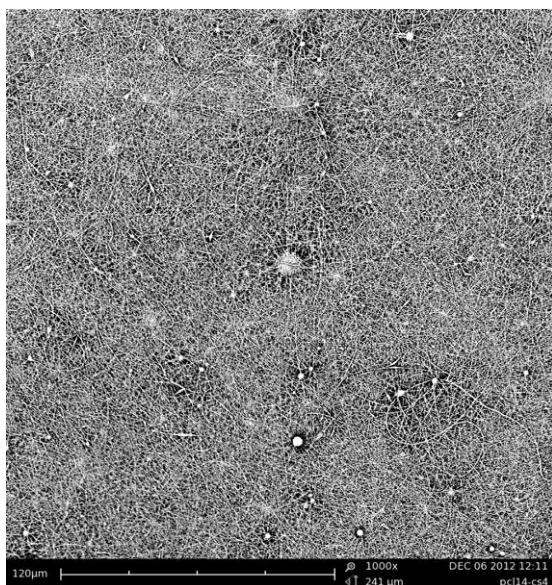
| | |
|----------------|-----------|
| Napětí | 56,1 kV |
| Průtok | 0,01 ml/h |
| Vzdálenost | 13 cm |
| Vlhkost | 48 % |
| Okolní teplota | 19,3°C |

Parametry vláken:

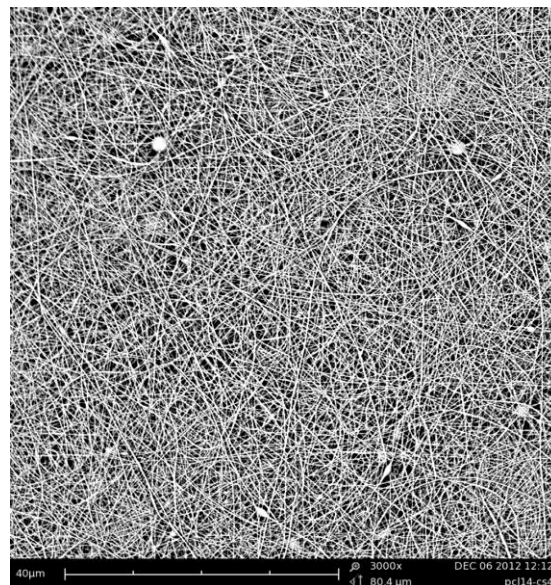
| | |
|----------------------------------|-----------|
| Průměrná hodnota průměru vláken | 171,26 nm |
| Směrodatná odchylka | 33,32 nm |
| Minimální hodnota průměru vláken | 99,75 nm |
| Maximální hodnota průměru vláken | 261,73 nm |



14% PCL a 4% CS 7:3 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 1000 x



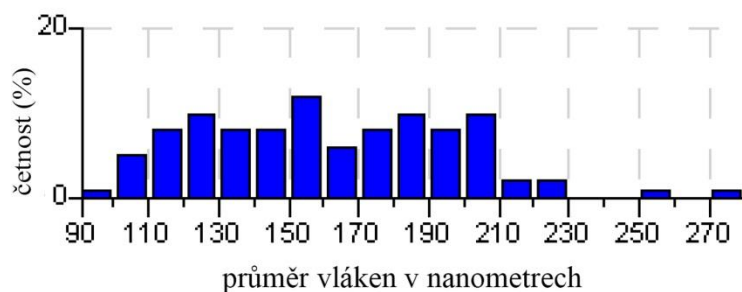
zvětšení 3000 x

Parametry zvlákňování:

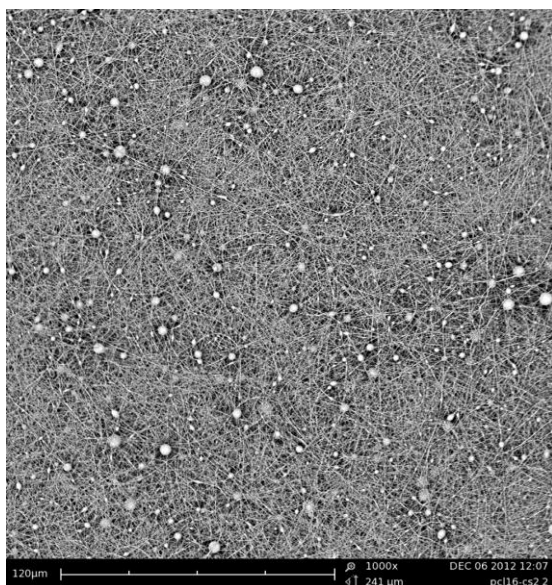
| | |
|----------------|-----------|
| Napětí | 50 kV |
| Průtok | 0,01 ml/h |
| Vzdálenost | 13 cm |
| Vlhkost | 48 % |
| Okolní teplota | 19,3°C |

Parametry vláken:

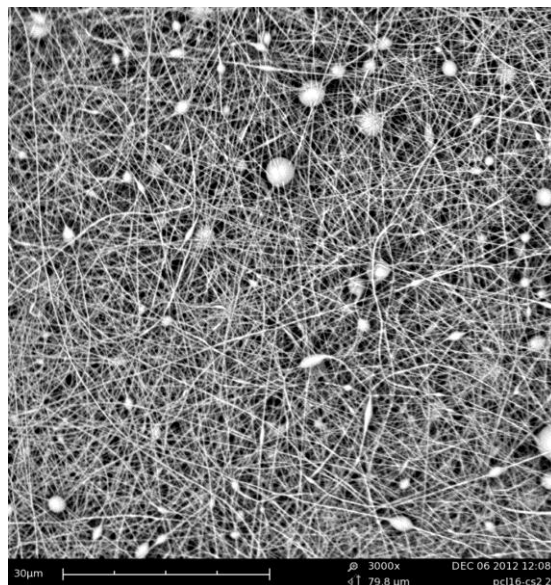
| | |
|----------------------------------|-----------|
| Průměrná hodnota průměru vláken | 162,02 nm |
| Směrodatná odchylka | 35,92 nm |
| Minimální hodnota průměru vláken | 99,75 nm |
| Maximální hodnota průměru vláken | 275,71 nm |



16% PCL a 2% CS 7:3 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 1000 x



zvětšení 3000 x

Parametry zvlákňování:

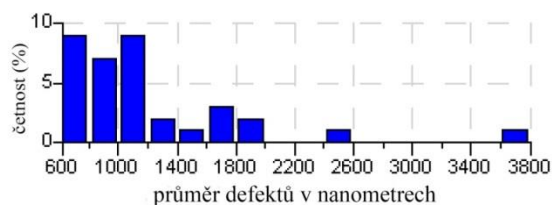
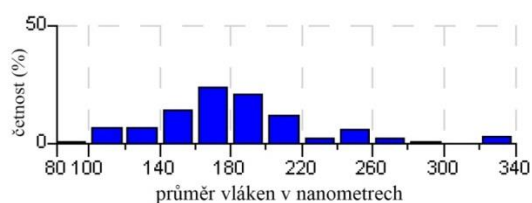
| | |
|----------------|-----------|
| Napětí | 46 kV |
| Průtok | 0,01 ml/h |
| Vzdálenost | 13 cm |
| Vlhkost | 47 % |
| Okolní teplota | 19,6°C |

Parametry vláken:

| | |
|----------------------------------|-----------|
| Průměrná hodnota průměru vláken | 183,44 nm |
| Směrodatná odchylka | 46,36 nm |
| Minimální hodnota průměru vláken | 98,03 nm |
| Maximální hodnota průměru vláken | 339,51 nm |

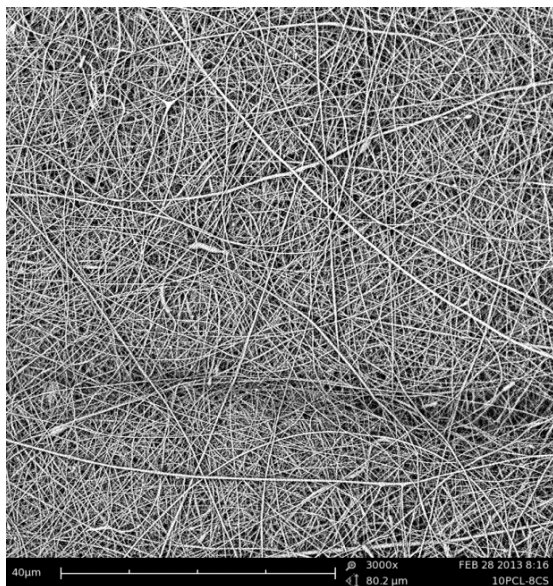
Parametr defektů:

| | |
|--------------------------|------------|
| Průměrná hodnota průměru | 1199,24 nm |
|--------------------------|------------|

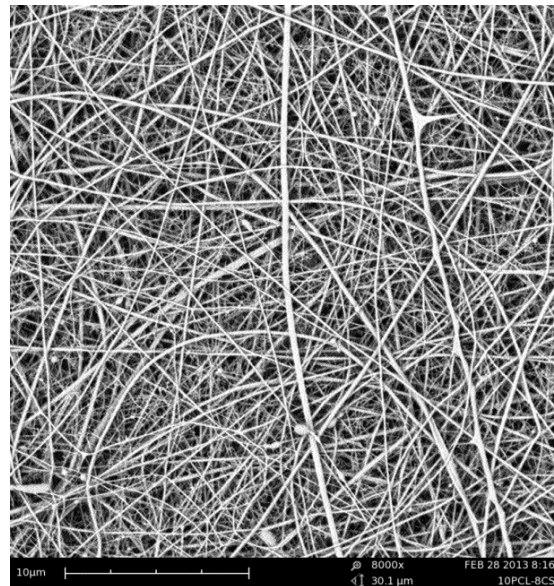


Příloha C: Materiály použité v experimentu

10% PCL a 8% CS 7:3 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 3000 x



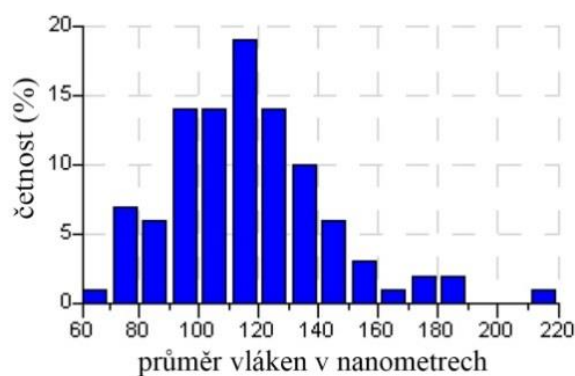
zvětšení 8000 x

Parametry zvlákňování:

| | |
|----------------|----------|
| Napětí | 54,9 kV |
| Průtok | 0,5 ml/h |
| Vzdálenost | 13 cm |
| Vlhkost | 35 % |
| Okolní teplota | 20,8°C |

Parametry vláken:

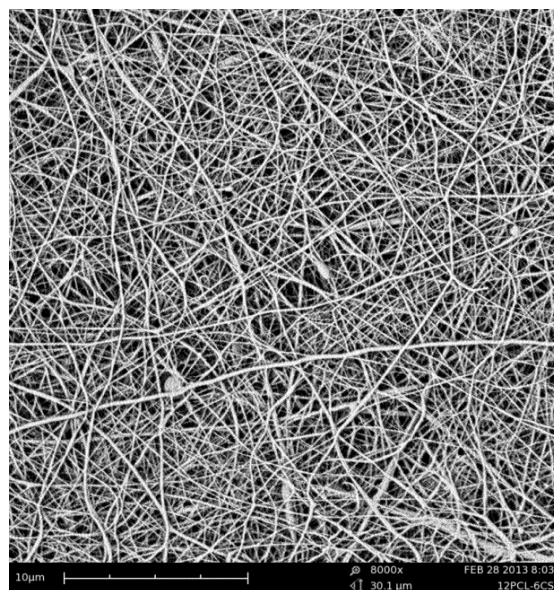
| | |
|----------------------------------|-----------|
| Průměrná hodnota průměru vláken | 115,89 nm |
| Směrodatná odchylka | 26,87 nm |
| Minimální hodnota průměru vláken | 64,69 nm |
| Maximální hodnota průměru vláken | 217,61 nm |



12% PCL a 6% CS 7:3 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 3000 x



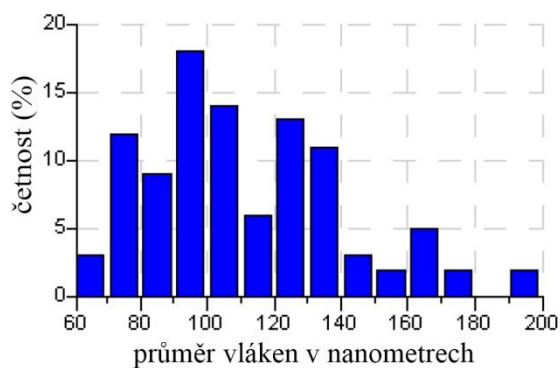
zvětšení 8000 x

Parametry zvlákňování:

| | |
|----------------|----------|
| Napětí | 51,8 kV |
| Průtok | 0,5 ml/h |
| Vzdálenost | 13 cm |
| Vlhkost | 47 % |
| Okolní teplota | 20,3°C |

Parametry vláken:

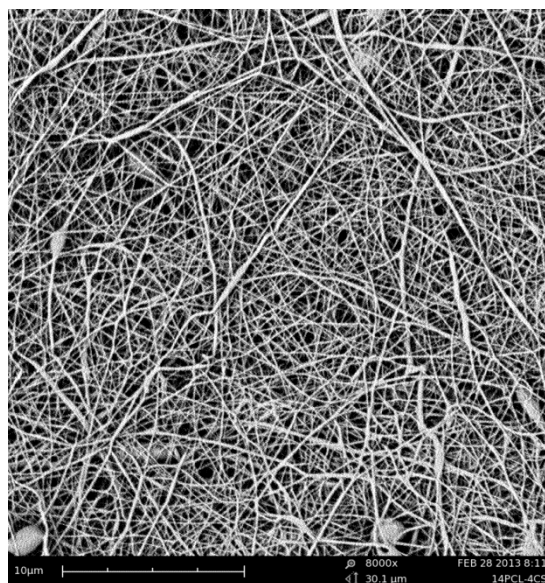
| | |
|----------------------------------|-----------|
| Průměrná hodnota průměru vláken | 111,39 nm |
| Směrodatná odchylka | 28,99 nm |
| Minimální hodnota průměru vláken | 67,52 nm |
| Maximální hodnota průměru vláken | 198,91 nm |



14% PCL a 4% CS 7:3 – kyselina mravenčí : kyselina octová



zvětšení 3000 x



zvětšení 8000 x

Parametry zvlákňování:

Napětí 50,5 kV

Průtok 0,5 ml/h

Vzdálenost 13 cm

Vlhkost 47 %

Okolní teplota 20,8°C

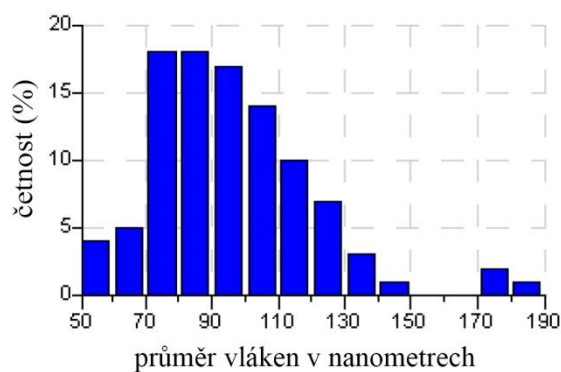
Parametry vláken:

Průměrná hodnota průměru vláken 96,52 nm

Směrodatná odchylka 24,22 nm

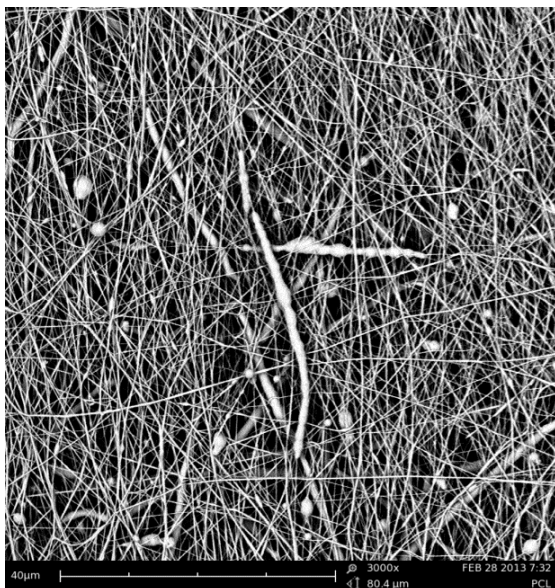
Minimální hodnota průměru vláken 50,53 nm

Maximální hodnota průměru vláken 182,94 nm

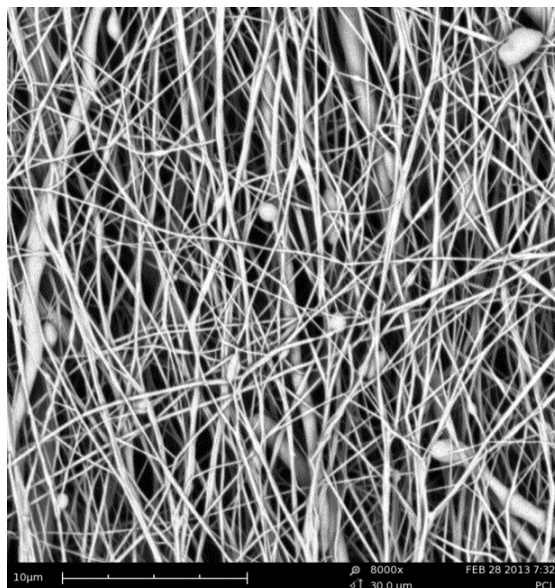


PCL z NANOSPEIDRU

**Polykaprolakton byl rozpuštěn v roztoku chloroformu a acetonu
v poměru 8:2**



zvětšení 3000 x



zvětšení 8000 x

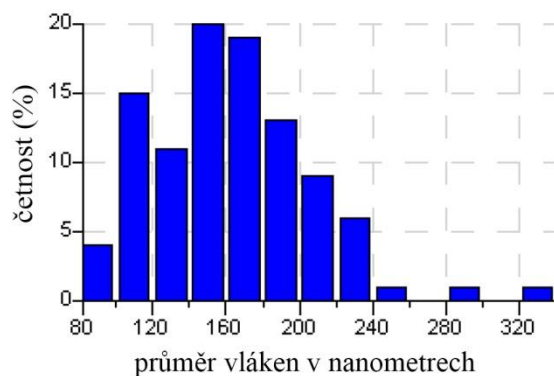
Parametry zvlákňování:

| | |
|------------|------|
| Napětí | kV |
| Průtok | ml/h |
| Vzdálenost | cm |
| Vlhkost | % |

Okolní teplota °C

Parametry vláken:

| | |
|----------------------------------|-----------|
| Průměrná hodnota průměru vláken | 159,77 nm |
| Směrodatná odchylka | 45,91 nm |
| Minimální hodnota průměru vláken | 75,86 nm |
| Maximální hodnota průměru vláken | 273,68 nm |



Příloha D: Průměry vláken

| Rozpouštědlový systém 3:7 (kyselina mravenčí:kyselina octová) | | | | |
|---|--------------|------------|-------------|-------------|
| hmotnostní zastoupení | prům.hodnota | směr.odch. | min.hodnota | max.hodnota |
| 8% PCL | - | - | - | - |
| 10%PCL | - | - | - | - |
| 12% PCL | - | - | - | - |
| 14% PCL | - | - | - | - |
| 16% PCL | 136,74 nm | 38,18 nm | 65,35 nm | 239,93 nm |
| 18% PCL | 158,15 nm | 45,13 nm | 68,88 nm | 263,2 nm |
| 20% PCL | 267,29 nm | 64,69 nm | 147,87 nm | 423,31 nm |

| Rozpouštědlový systém 7:3 (kyselina mravenčí:kyselina octová) | | | | |
|---|--------------|------------|-------------|-------------|
| hmotnostní zastoupení | prům.hodnota | směr.odch. | min.hodnota | max.hodnota |
| 8% PCL | - | - | - | - |
| 10%PCL | 151,02 nm | 32,53 nm | 85,21 nm | 246 nm |
| 12% PCL | 155,46 nm | 33,52 nm | 92,48 nm | 268,65 nm |
| 14% PCL | 160,98 nm | 38,1 nm | 83,69 nm | 266,28 nm |
| 16% PCL | 142,01 nm | 29,62 nm | 81,88 nm | 223,17 nm |
| 18% PCL | 168,51 nm | 37,96 nm | 99,91 nm | 320,52 nm |
| 20% PCL | 164,21 nm | 46,48 nm | 70,69 nm | 346,85 nm |

| Rozpouštědlový systém 7:3 (kyselina mravenčí:kyselina octová) – systém jedné jehly | | | | |
|--|--------------|------------|-------------|-------------|
| hmotnostní zastoupení | prům.hodnota | směr.odch. | min.hodnota | max.hodnota |
| 10%PCL+8% CS | 170,95 nm | 41,17 nm | 98,89 nm | 293,71 nm |
| 12%PCL+6% CS | 171,26 nm | 33,32 nm | 99,75 nm | 261,73 nm |
| 14%PCL+4% CS | 162,02 nm | 35,92 nm | 99,75 nm | 275,71 nm |
| 16%PCL+2% CS | 183,44 nm | 46,36 nm | 98,03 nm | 339,51 nm |

Rozpouštědlový systém 7:3 (kyselina mravenčí:kyselina octová) – systém dvou jehel

| hmotnostní zastoupení | prům.hodnota | směr.odch. | min.hodnota | max.hodnota |
|------------------------------|---------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| 10%PCL+8% CS | 115,89 nm | 26,87 nm | 64,69 nm | 217,61 nm |
| 12%PCL+6% CS | 111,39 nm | 28,99 nm | 67,52 nm | 198,91 nm |
| 14%PCL+4% CS | 96,52 nm | 24,22 nm | 50,53 nm | 182,94 nm |

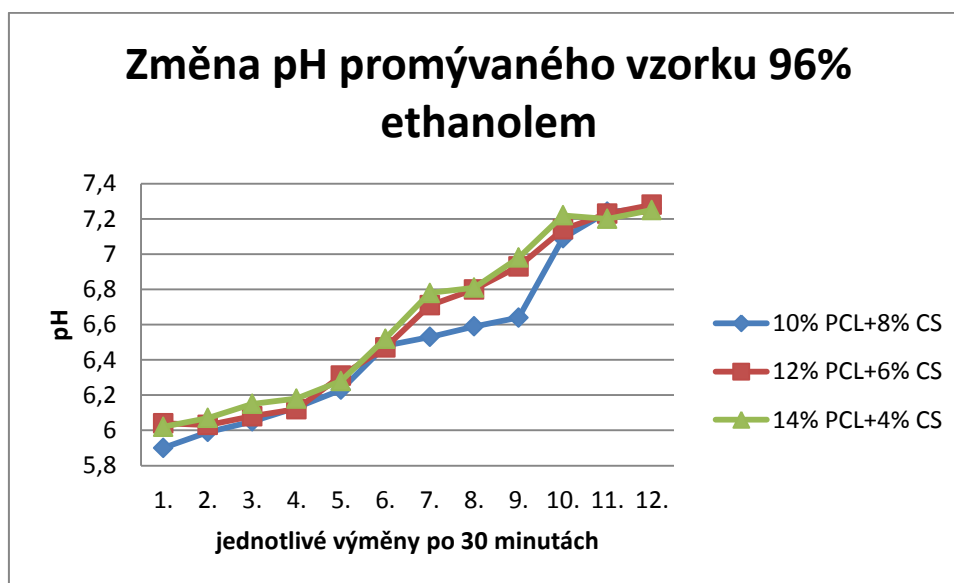
Polykaprolakton ze speidru

| hmotnostní zastoupení | prům.hodnota | směr.odch. | min.hodnota | max.hodnota |
|------------------------------|---------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| PCL | 159,77 nm | 45,91 nm | 75,86 nm | 273,68 nm |

Příloha E: Výsledky pH při promývání výsledných materiálů 96% ethanolem

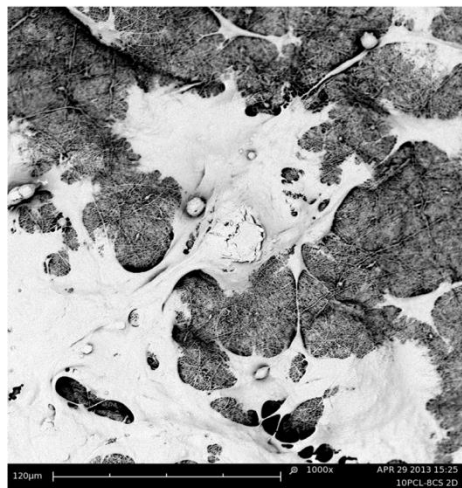
Materiál o velikosti 10 x 10 byl promýván pokaždé 25 ml 100% ethanolu s pH 7,27.

| pH po 30 minutách louhování | 10% PCL+8% CS | 12% PCL+6% CS | 14% PCL+4% CS |
|-----------------------------|---------------|---------------|---------------|
| 1. | 5,9 | 6,04 | 6,02 |
| 2. | 5,99 | 6,03 | 6,07 |
| 3. | 6,05 | 6,08 | 6,15 |
| 4. | 6,13 | 6,12 | 6,18 |
| 5. | 6,23 | 6,31 | 6,28 |
| 6. | 6,48 | 6,47 | 6,52 |
| 7. | 6,53 | 6,71 | 6,78 |
| 8. | 6,59 | 6,8 | 6,81 |
| 9. | 6,64 | 6,93 | 6,98 |
| 10. | 7,09 | 7,14 | 7,22 |
| 11. | 7,24 | 7,23 | 7,20 |
| 12. | 7,26 | 7,28 | 7,25 |

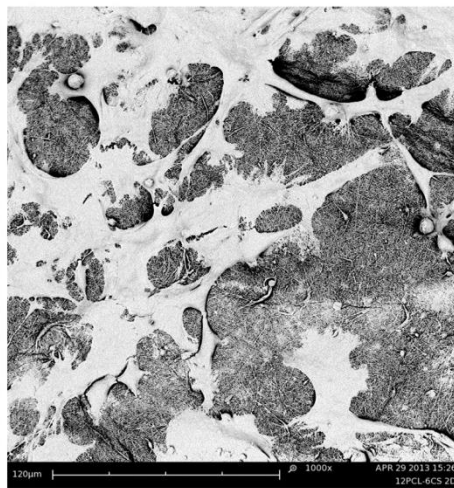


Příloha F: SEM snímky tkáňového nosiče s buňkami po dvou, sedmy a dvanácti dnech (zvětšení 1000x)

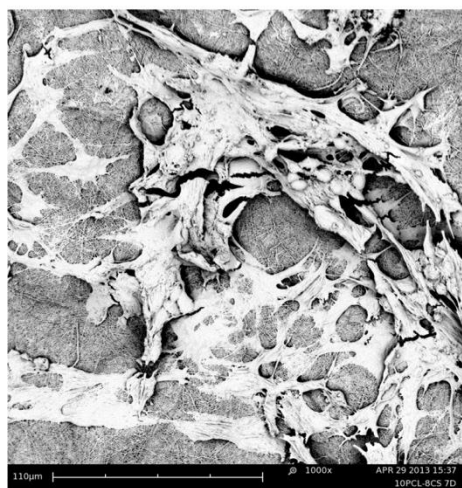
10% PCL + 8% CS - 2. den



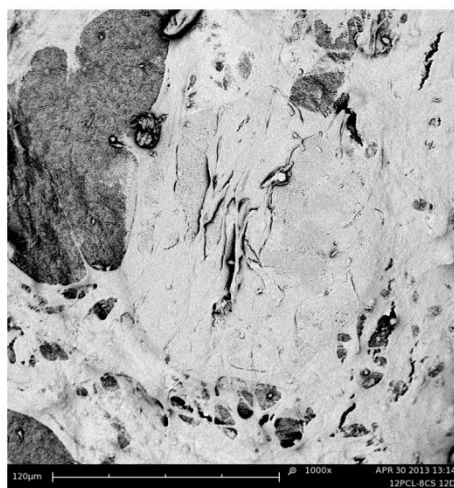
12% PCL + 6% CS - 2. den



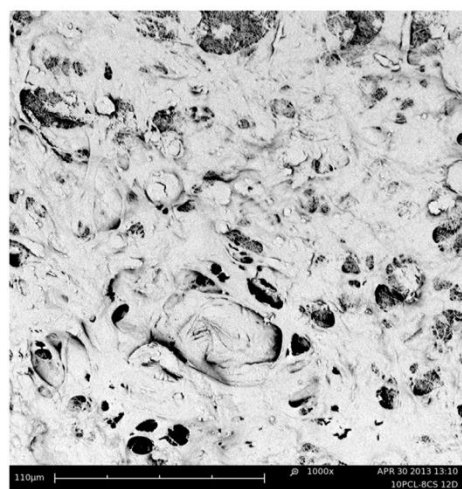
10% PCL + 8% CS - 7. den



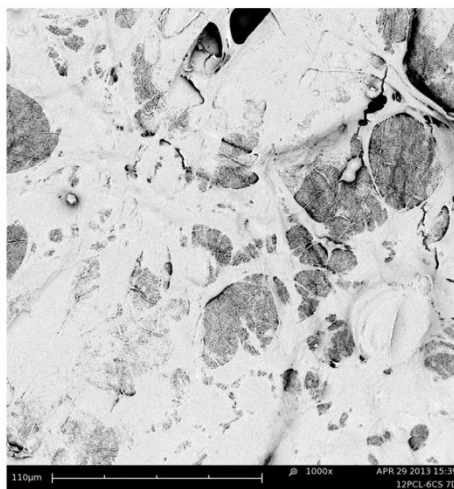
12% PCL + 6% CS - 7. den



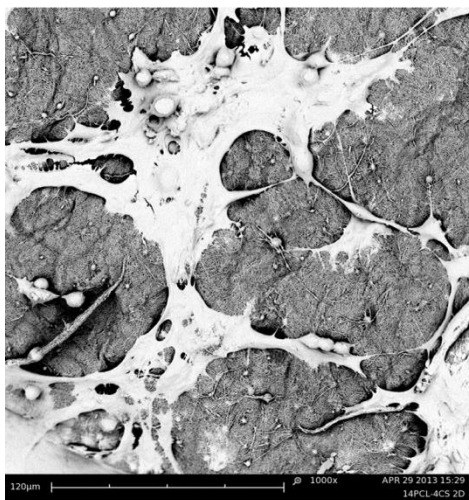
10% PCL + 8% CS - 12. den



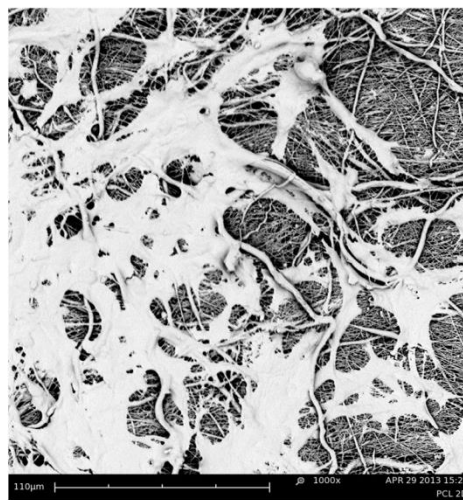
12% PCL + 6% CS - 12. den



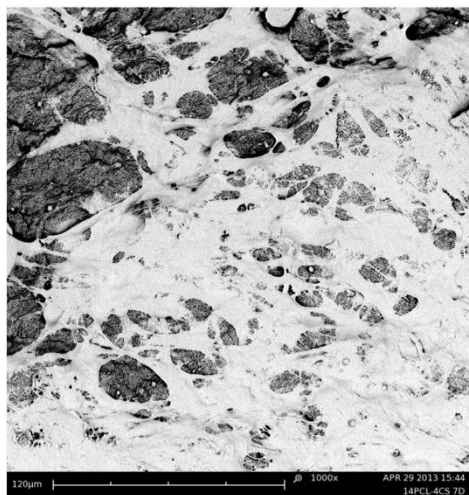
14% PCL + 4% CS - 2 . den



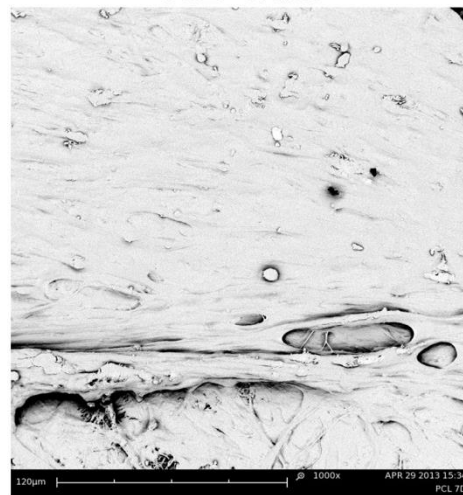
PCL - 2. den



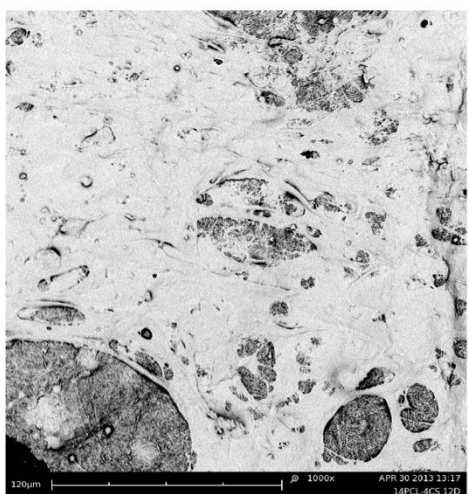
14% PCL + 4% CS - 7. den



PCL - 7. den



14% PCL + 4% CS - 12. den

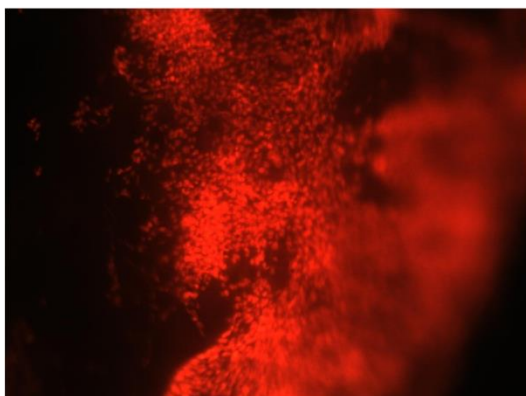


PCL - 12. den

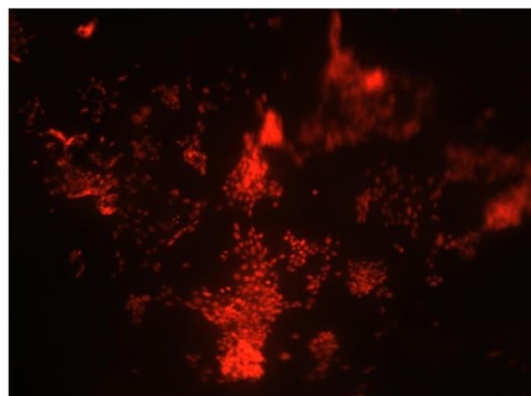


Příloha G: Snímky z fluorescence

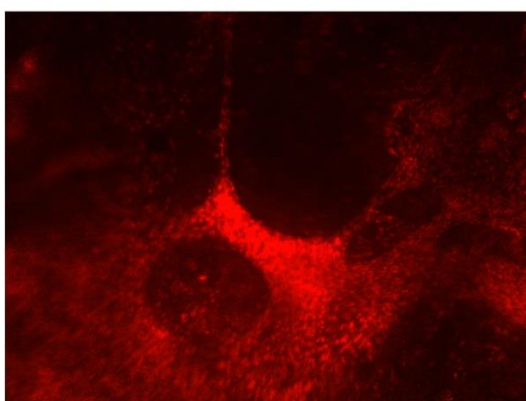
10% PCL + 8% CS - 2. den



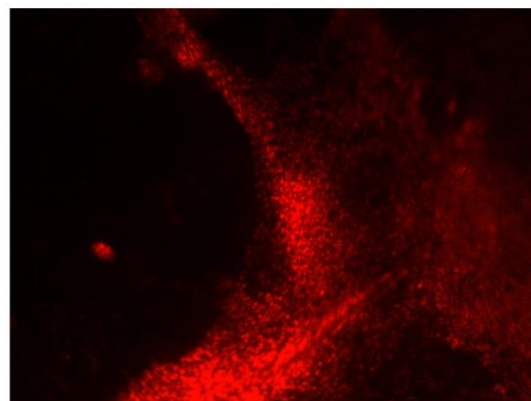
12% PCL + 6% CS - 2. den



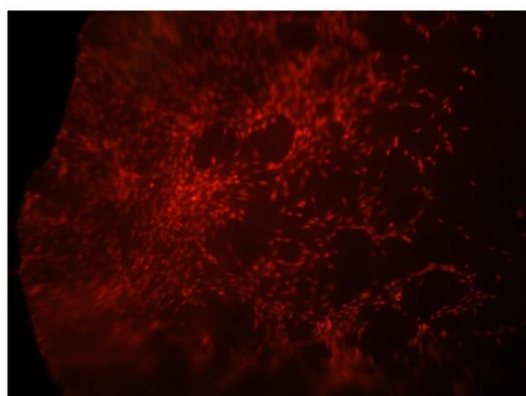
10% PCL + 8% CS - 7. den



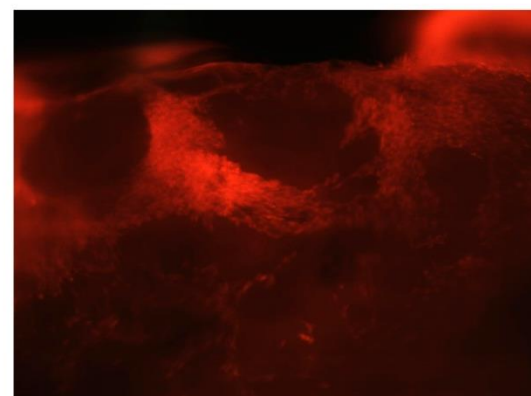
12% PCL + 6% CS - 7. den



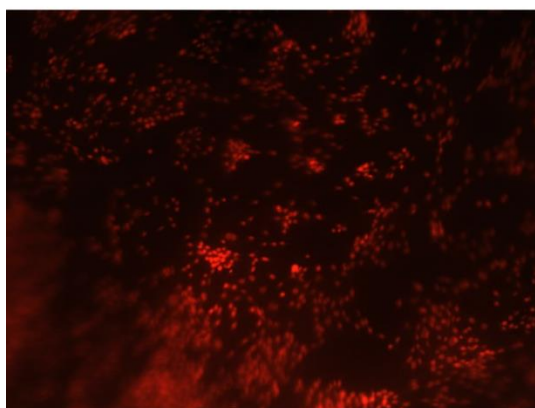
10% PCL + 8% CS - 12. den



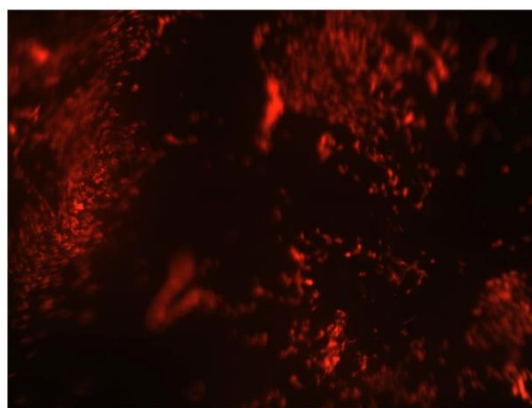
12% PCL + 6% CS - 12. den



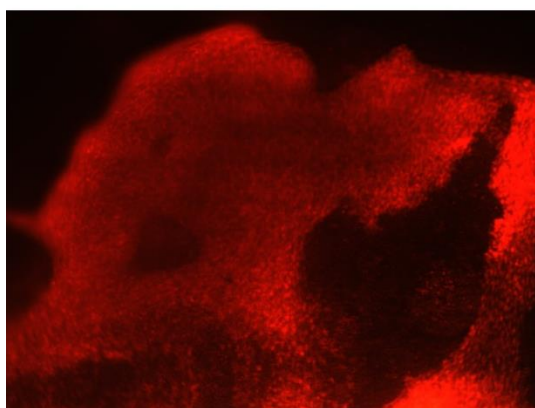
14% PCL + 4% CS - 2. den



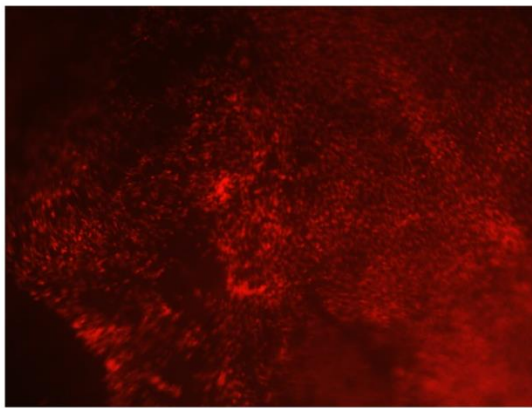
PCL - 2. den



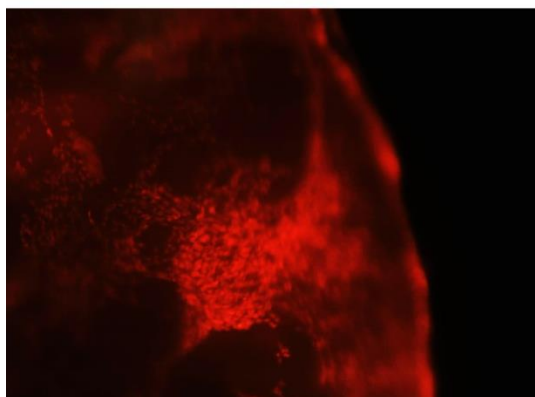
14% PCL + 4% CS - 7. den



PCL - 7. den



14% PCL + 4% CS - 12. den



PCL - 12. den

